

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELLA TESI

**STUDIO DEGLI EFFETTI DELLA STIMOLAZIONE
TRANSCRANICA A CORRENTE DIRETTA (tDCS) SUI
POTENZIALI EVOCATI VISIVI STEADY STATE**

Tesi in

Bioingegneria della Riabilitazione LM

Relatore

Prof. Angelo Cappello

Presentato da

Alan Fabbri

Correlatore

Ing. Anna Lisa Mangia

Sessione III

Anno Accademico 2012-2013

Indice

<i><u>Introduzione</u></i>	V
----------------------------------	---

<i><u>Capitolo 1: I potenziali evocati visivi steady state</u></i>	
<i><u>(SSVEP) e la stimolazione transcranica in corrente</u></i>	
<i><u>continua (tDCS)</u></i> 1	
1.1	Basi neurofisiologiche 2
1.1.1	Generazione del segnale elettrico corticale..... 2
1.1.2	Registrazione con l'EEG..... 7
1.2	SSVEP 12
1.2.1	Fondamenti 12
1.2.2	VEP e il percorso visivo 14
1.2.3	Definizioni: VEP transitorio vs SSVEP 16

1.2.4	Esperimenti: VEP transitorio vs SSVEP.....	18
1.2.5	Sorgenti di SSVEP: teorie ed esperimenti	22
1.2.6	Componenti SSVEP.....	24
1.2.7	Applicazioni nelle neuroscienze cognitive	25
1.2.7.1	Attenzione visiva	26
1.2.7.2	Competizione binoculare	26
1.2.7.3	Applicazioni nelle neuroscienze cliniche ...	27
1.2.7.4	Epilessia.....	27
1.2.7.5	SSVEP per le Brain Computer Interfaces (BCI).....	28
1.2.7.6	Sviluppi per le BCI	30
1.3	tDCS: stimolazione transcranica in corrente continua.....	31
1.3.1	Parametri biofisiologici dell'applicazione della tDCS nell'uomo	32
1.3.2	Applicazioni della tDCS sul cervello umano.....	36

Capitolo 2: Materiali e metodi.....39

2.1	L'esperimento	40
2.1.1	Soggetti	40
2.1.2	tDCS.....	40
2.1.3	Registrazione dei SSVEP.....	46
2.1.4	Protocollo	47
2.1.4.1	La stimolazione luminosa	48
2.1.4.2	L'elettrostimolazione	48
2.1.5	OpenVibe	50
2.1.5.1	Scenario: ssvep-bci-1-configuration	52
2.1.5.2	Scenario: ssvep-bci-2-training-acquisition ...	55

2.2	Elaborazione dei dati	58
2.2.1	Pre-processing a analisi esplorativa	58
2.2.2	Analisi statistica	62
2.2.2.1	I test di gaussianità dei dati	62
2.2.2.2	Il test di Friedman	63
2.2.2.3	I confronti multipli	64
2.2.2.4	Effetto della stimolazione	66
2.2.2.5	Effetto della frequenza	67
2.2.2.6	Effetto del colore	67

Capitolo 3: Risultati

3.1	Analisi esplorativa	70
3.1.1	Confronto tra stimolazioni: 12 Hz-Rosso	73
3.1.2	Confronto tra stimolazioni: 15 Hz-Rosso	75
3.1.3	Confronto tra stimolazioni: 20 Hz-Rosso	77
3.1.4	Confronto tra stimolazioni: 12 Hz-Giallo	79
3.1.5	Confronto tra stimolazioni: 15 Hz-Giallo	81
3.1.6	Confronto tra stimolazioni: 20 Hz-Giallo	83
3.2	Analisi statistica	85
3.2.1	Effetto stimolazione	85
3.2.2	Effetto frequenza	92
3.2.3	Effetto colore	93

Conclusioni

<i><u>Bibliografia</u></i>	99
---	----

Introduzione

Oggetto del presente lavoro di tesi è lo studio dei potenziali evocati visivi steady state (SSVEP) in condizioni fisiologiche e in seguito a stimolazione transcranica in corrente continua (tDCS).

I SSVEP consistono in una perturbazione dell'attività elettrica cerebrale spontanea ed insorgono in presenza di stimoli visivi come, per esempio, luci monocromatiche modulate sinusoidalmente. Nel tracciato EEG si instaurano oscillazioni di piccola ampiezza ad una frequenza pari a quella dello stimolo. Il termine steady state, cioè a regime stazionario, deriva dal fatto che le caratteristiche di fase e ampiezza si mantengono costanti per un lungo periodo. Queste due caratteristiche sono visibili con difficoltà nel dominio del tempo ma sono ben osservabili nel dominio delle frequenze. Applicando la trasformata di Fourier al segnale nel dominio del tempo, in particolare stimando la densità spettrale di potenza (PSD) i SSVEP si manifestano come picchi ben distinguibili in corrispondenza della frequenza dello stimolo luminoso e nelle sue armoniche superiori.

Per visualizzare i SSVEP è necessario quindi evocarli con degli stimoli luminosi opportunamente generati. A questo scopo, è stata utilizzata la piattaforma software

OpenViBE. OpenViBE è un linguaggio di programmazione open-source visuale che è stato ideato e sviluppato con l'obiettivo di rendere pratica e facilmente accessibile l'ideazione e lo sviluppo di Brain Computer Interface (BCI). Le BCI instaurano un collegamento cervello-calcolatore che permette di portare a termine azioni senza compiere atti motori. Una tipologia di BCI utilizza proprio SSVEP come input per svolgere dei comandi.

Il primo obiettivo dello studio è quindi quello di realizzare un sistema che sia in grado di generare e registrare opportunamente i SSVEP.

Il secondo obiettivo dello studio è stato quello di studiare gli effetti della tDCS sui SSVEP.

La tDCS è una tecnica di stimolazione cerebrale non invasiva che ha dimostrato effetti terapeutici in diverse condizioni.

Il meccanismo con cui la tDCS espleta questi effetti terapeutici è la modulazione dell'eccitabilità corticale. Gli studi condotti nel recente passato [1, 2] hanno messo in evidenza che in linea generale una stimolazione di tipo anodico aumenta l'ampiezza dei potenziali misurati mentre una stimolazione con polarità inversa, la stimolazione catodica la diminuisce. Si è quindi pensato di valutare gli effetti della tDCS su un'altra tipologia di potenziali visivi con un duplice scopo:

- Meglio comprendere i processi neurofisiologici e le loro modificazioni che derivano dalla stimolazione con la tDCS
- Cercare quei parametri di stimolazione ottimale che consentano di ottenere dei SSVEP quanto più discriminabili possibili con lo scopo di migliorare le performance delle BCI basate su questo principio

Gli aspetti salienti del protocollo implementato sono:

- La sincronizzazione tra stimolo luminoso e registrazione del segnale elettroencefalografico
- La registrazione dei SSVEP in diverse condizioni di stimolazione (Baseline, Sham, Anodica, Post Anodica)

- La registrazione del tracciato EEG in contemporanea alla stimolazione in corrente continua

La sincronizzazione è stata effettuata impostando i parametri della stimolazione luminosa in modo tale da avere una conoscenza a priori degli eventi; è di fondamentale importanza essere conoscere gli istanti di tempo in cui avvengo le stimolazioni luminose per inferire correttamente dallo spettro di potenza, lo stimolo che il soggetto sta osservando.

Le condizioni di stimolazione consistono in quattro fasi differenti: per prima cosa occorre avere un riferimento con cui confrontare le varie stimolazioni (baseline). In secondo luogo, per vedere se la stimolazione anodica ha riscontri oggettivi occorre confrontarla con una stimolazione di controllo (sham). Gli effetti successivi al termine della stimolazione anodica sono misurati nella fase post anodica.

La registrazione del tracciato EEG concomitante alla stimolazione anodica è stata effettuata tramite la realizzazione di un anodo in silicone conduttivo contenuto in una spugnetta imbevuta di soluzione salina, che si adattasse al meglio alle particolari condizioni. Dato che la stimolazione viene effettuata in Oz, secondo il sistema internazionale 10-20 e gli elettrodi per la misurazione dei potenziali sono situati in O1,PO7,O2,PO8, quindi nelle immediate vicinanze, l'anodo è stato progettato con una forma che interferisse il meno possibile con gli elettrodi sullo scalpo.

Una volta acquisito, il segnale è stato preconditionato ed elaborato in ambiente MATLAB. Le grandezze prese in analisi sono le PSD normalizzate (PSDn) rispetto alla fase di riposo in condizioni Baseline, in cui il soggetto non viene sollecitato con la stimolazione luminosa. Da queste PSDn sono state estratte le potenze contenute nelle frequenze corrispondenti a quelle proprie degli stimoli luminosi e le relative seconde armoniche. Lo studio è stato condotto su sei soggetti sani.

Gli spettri di ogni singolo soggetto sono stati accorpati e mediati per ottenere uno spettro complessivo più pulito e significativo, mentre sulle potenze è stata effettuata un'analisi statistica per osservare eventuali differenze significative tra le diverse popolazioni.

La presente tesi si articola in 4 parti:

- Capitolo 1: I potenziali evocati Visivi Steady State (SSVEP) e la stimolazione transcranica in corrente continua (tDCS)
- Capitolo 2 Materiali e Metodi dell'esperimento
- Capitolo 3 Risultati ottenuti
- Discussione dei risultati e Conclusioni

Il capitolo 1 fornisce il background di conoscenze su cui si basa l'elaborato. Dopo aver introdotto le basi fisiologiche che stanno alla base del segnale elettroencefalografico, vengono descritti gli SSVEP, dando loro una definizione, caratterizzando i percorsi visivi dai quali si generano e introducendo le loro caratteristiche misurabili e gli ambiti di applicazione. La terza sezione di questo capitolo è dedicata alla tDCS; in questa sede si tratta dei meccanismi biologici che ne stanno alla base e delle norme di sicurezza da rispettare.

Nel capitolo 2 vengono descritti il protocollo sperimentale e l'elaborazione dei dati a valle dell'acquisizione. La prima sezione entra nel dettaglio dell'esperimento elencando tutti i parametri che lo caratterizzano, dalla stimolazione luminosa alla stimolazione tDCS. La seconda parte descrive la catena di elaborazione che ha portato alla selezione dei dati significativi per condurre l'analisi statistica.

Il capitolo 3 riporta i risultati del lavoro svolto. Si articola in due parti: analisi esplorativa e analisi statistica. L'analisi esplorativa mostra i grafici relativi alla PSDn confrontando le diverse condizioni di stimolazione. L'analisi statistica interpreta la distribuzione delle potenze estratte dagli spettri durante i singoli trial. Inoltre vengono confrontati gli effetti che hanno le frequenze di stimolazione e i colori sulle potenze che hanno gli SSVEP.

Le conclusioni interpretano i risultati ottenuti in questo contesto, mettono in evidenza gli aspetti critici dell'esperimento e indicano i possibili sviluppi futuri.

Capitolo 1

I Potenziali Evocati Visivi Steady State (SSVEP) e la Stimolazione Transcranica in Corrente Continua (tDCS)

Il capitolo è suddiviso in tre parti. La prima è dedicata all'elettroencefalografia, la seconda al fenomeno oggetto di studio: SSVEP e la terza spiega le caratteristiche salienti della tDCS.

1.1 Basi Neurofisiologiche [3]

1.1.1 Generazione del segnale elettrico corticale

La corteccia cerebrale è la più importante parte del sistema nervoso centrale e le diverse regioni che la compongono sono responsabili dei più importanti processi vitali quali ad esempio l'apprendimento, i movimenti volontari, la percezione. Essa costituisce la parte periferica degli emisferi cerebrali ed è caratterizzata da numerosi giri e solchi che ne incrementano così la superficie. In media è composta da 10^{10} cellule nervose, i neuroni corticali, fortemente interconnessi tra loro, tant'è che la superficie di ognuno di essi può essere ricoperta da 10^4 a 10^5 sinapsi che trasmettono input provenienti da altri neuroni.

Gli input sinaptici verso un neurone possono essere di due tipi: quelli che producono *potenziali postsinaptici eccitatori (PPSE)* e quelli che inducono *potenziali postsinaptici inibitori (PPSI)*. I primi, provocano una depolarizzazione nella membrana postsinaptica del neurone, aumentando così la probabilità che venga generato un potenziale d'azione; i secondi agiscono in modo contrario, iperpolarizzando la membrana del neurone, abbassando così la probabilità che quest'ultimo scarichi un potenziale d'azione. Ogni neurone è raggiunto sia da terminazioni eccitatorie sia inibitorie, pertanto la somma temporale e spaziale di tutti i PPSE e PPSI determina l'effetto finale: eccitatorio o inibitorio.

I neuroni corticali possono essere classificati in due principali categorie: *cellule piramidali* e *cellule non piramidali*.

Le **cellule piramidali** costituiscono la parte preponderante della corteccia cerebrale e giocano un ruolo fondamentale nella generazione dell'EEG. Esse proiettano sia lunghi assoni ad altre regioni sia all'interno dell'area tramite collaterali assoniche che decorrono anche per molti millimetri in piani paralleli agli strati corticali. La caratteristica principale di queste cellule che, grazie alla loro morfologia, concorrono alla buona integrazione dei segnali afferenti è dovuta all'orientazione perpendicolare alla corteccia dei loro dendriti.

Le **cellule non piramidali** sono caratterizzate da forma ovale e in genere i loro assoni non lasciano la corteccia, ma terminano su neuroni vicini. Il loro orientamento spaziale rispetto alla corteccia non è ordinato come per le cellule piramidali: alcuni sono orientati orizzontalmente altri verticalmente [4], pertanto non partecipano in modo importante alla generazione dell'EEG.

Il *segnale elettroencefalografico (EEG)* è una misura del flusso di corrente extracellulare che viene generato dalla somma delle attività di un elevato numero di neuroni [5]. Il contributo elettrico del singolo neurone corticale non può essere misurato sullo scalpo a causa dell'attenuazione provocata dai tessuti (fluidi, ossa, pelle) interposti tra la sorgente (la corteccia) e l'area di rilevazione (l'elettrodo). Il segnale EEG, perciò, riflette la somma delle attività elettriche di milioni e milioni di neuroni che hanno un'orientazione spaziale simile.

I potenziali di superficie captati dagli elettrodi sono principalmente il risultato dell'attività dei neuroni corticali piramidali. Data la loro organizzazione corticale e la struttura intrinseca, la loro attivazione simultanea genera campi elettrici aperti che, se sincroni, si sommano generando un segnale più intenso e rilevabile dagli elettrodi sullo scalpo.

Le attività elettriche descritte dai tracciati EEG derivano quasi totalmente da potenziali post sinaptici (eccitatori e inibitori) e non dai potenziali d'azione,

sebbene quest'ultimi siano i più ampi potenziali generati dai neuroni. Questo è dovuto alla loro breve durata, dell'ordine di 1 ms , a differenza dei potenziali postsinaptici che nonostante la loro minore ampiezza, sono più lenti e quindi possono sommarsi più efficacemente.

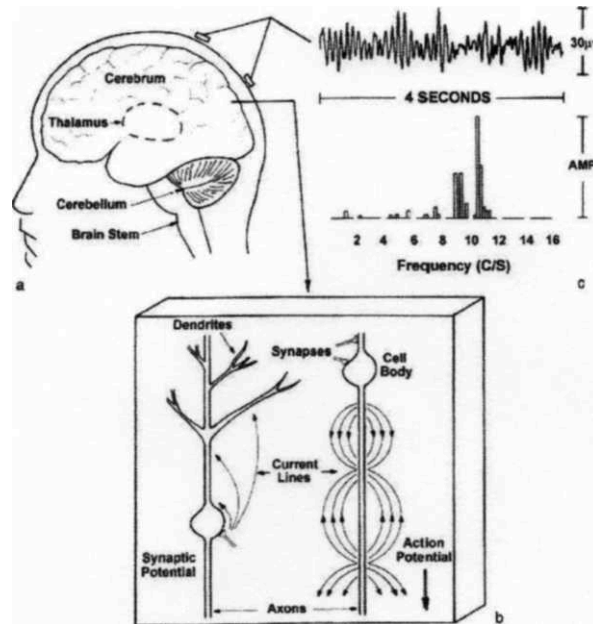


Figura 1.1: (a) Il cervello umano. (b) Sezione della corteccia cerebrale e schema della generazione delle microcorrenti causate da potenziali d'azione e sinaptici. (c) Ciascun elettrodo EEG sullo scalpo registra l'attività media generata da sorgenti corticali presenti in diversi centimetri quadri. Rappresentazione di un'epoca di 4 secondi del ritmo alfa e il corrispondente spettro di potenza [6].

L'intera attività elettrica corticale presenta oscillazioni caratterizzate diversamente da ampiezza e frequenza e indicate col termine *ritmi*. L'ampiezza del segnale EEG dipende soprattutto dal grado di sincronia col quale i neuroni corticali interagiscono. L'eccitazione asincrona di un gruppo di neuroni genera un segnale EEG irregolare e con oscillazioni di bassa ampiezza. Un'eccitazione sincrona, invece, produce un segnale di grande ampiezza dovuto alla sommazione temporale dei singoli contributi elettrici. La frequenza delle oscillazioni nell'EEG

è correlata alle proprietà pacemaker dei neuroni del talamo e a meccanismi di feedback che avvengono nel circuito neuronale.

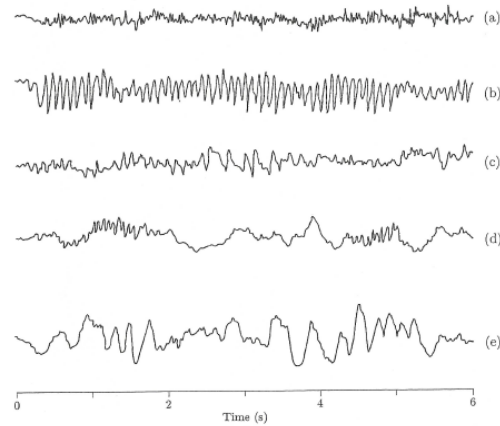


Figura 1.2: Ritmi EEG osservati durante vari stati di coscienza: (a) eccitazione, (b) relax, (c) sonnolenza, (d) sonno (e) sonno profondo [7]

Come si vede in figura 1.2, i tracciati EEG sono caratterizzati da fluttuazioni di voltaggio spontanee associabili a diversi stati mentali, di livelli di coscienza o disturbi patologici [4]. I ritmi con alta frequenza e bassa ampiezza riflettono attività cerebrali associate allo stato di sogno o di allerta, mentre ritmi con bassa frequenza e maggiore ampiezza si registrano durante lo stato di sonno profondo. Infatti, quando la corteccia è attivamente occupata nel processo di informazioni, o nella generazione di input sensoriali come avviene nello stato di allerta, il livello di attività neuronale è relativamente alto ma anche asincrono. Questo perché ogni singolo neurone, o un piccolo gruppo di neuroni, è occupato in uno specifico aspetto del complesso compito cognitivo; si attiva rapidamente ma con poca sincronia rispetto ai neuroni adiacenti. Durante lo stato di sonno profondo, invece, un gran numero di neuroni corticali, non essendo occupati in un'intensa elaborazione, viene eccitato in fase da un input comune, generando una risposta altamente sincrona e producendo così un segnale EEG dotato di una maggiore ampiezza [7].

Le oscillazioni hanno caratteristiche bande di frequenza, distribuzioni spaziali e sono associate a differenti stati cerebro-funzionali. I ritmi dell'EEG sono classificati in ritmo δ , θ , α , β e γ .

- Il ritmo delta (δ) ha oscillazioni a frequenze inferiori di 4 Hz ; tipicamente non è presente in condizioni fisiologiche ed è pertanto associato a stati patologici.
- Il ritmo theta (θ) presenta oscillazioni nella banda 4-7 Hz ed è presente durante stati di sonno profondo.
- Il ritmo alfa (α) è caratterizzato da oscillazioni nella banda 8 e 13 Hz , ha un'ampiezza media di 30 μV e viene registrato ad occhi chiusi in un soggetto sveglio; viene tipicamente correlato a stati di rilassamento mentale.
- Il ritmo beta (β) è un ritmo molto veloce, con oscillazioni tra 14 e 30 Hz . Ha una piccola ampiezza, 1-20 μV , ed è associato ad aree attive della corteccia e livelli di coscienza come l'attenzione e la concentrazione.
- Il ritmo gamma (γ) ha oscillazioni con frequenze superiori a 30 Hz e con bassa ampiezza; è legato a stati di elaborazione attiva delle informazioni della corteccia ed è tipicamente osservato durante il movimento delle dita.

Nell'uomo, in condizioni di normalità, l'ampiezza dei potenziali registrati sullo scalpo varia da 10 a 100 μV e viene distinta in

- bassa ($< 30 \mu V$),

- media (30-70 μV);
- alta ($> 70 \mu V$).

Le oscillazioni hanno frequenze comprese tra 0.5-1 e 50-60 Hz .

1.1.2 Registrazione con l'EEG

L'EEG misura la differenza di potenziale presente tra un elettrodo attivo, posto al di sopra della sede dove si svolge l'attività neuronale, ed un elettrodo di riferimento, collocato ad una certa distanza dal primo. La registrazione dell'attività elettrica corticale tramite elettroencefalogramma garantisce numerosi vantaggi e offre possibilità di analizzare aspetti unici rispetto alle tecniche utilizzate in neuroimaging (fMRI, PET, SPECT):

- tecnica non invasiva;
- costi hardware significativamente bassi;
- la registrazione è effettuata tramite sensori e non con ingombranti strumenti immobili. Questo permette ampi campi applicabilità.
- alta risoluzione temporale, nell'ordine dei millisecondi;
- la misura può essere effettuata anche su soggetti in movimento;
- la strumentazione impiegata è silenziosa, questo permette un migliore studio della risposta a stimoli uditivi;
- non provoca o aggrava sensazioni di claustrofobia nei soggetti durante l'acquisizione del segnale,
- non espone il soggetto a campi magnetici ad alta intensità, come avviene nell'MRI o a radioligandi come nella PET [8].

I tracciati EEG descrivono in modo dettagliato e preciso l'attività elettrica temporale, permettendo di individuare variazioni di potenziale con risoluzione temporale nell'ordine dei millisecondi. A fronte dell'ottima risoluzione temporale, l'EEG non possiede una buona risoluzione spaziale che consenta una corretta localizzazione delle sorgenti elettriche corticali. Essa, infatti, è nell'ordine del centimetro quadro e corrisponde all'attività media di circa 10 milioni di neuroni corticali.

Gli artefatti riscontrabili in un tracciato EEG possono essere classificati in base alla sorgente principale che li causa: il soggetto o la tecnologia. Gli artefatti *soggetto-dipendenti* derivano da qualsiasi piccolo movimento del corpo, movimento degli occhi, dalla sudorazione; gli artefatti *tecnologia-dipendenti* riguardano le componenti a 50-60 **Hz**, le fluttuazioni di impedenza, il movimento dei cavi e il materiale usato come gel conduttore tra gli elettrodi e lo scalpo.

Le principali tecniche di misurazione del segnale EEG sono *l'EEG convenzionale* e *l'EEG ad alta risoluzione*. Quest'ultimo è stato studiato e sviluppato per migliorare e superare alcuni dei problemi e limiti correlati all'uso dell'EEG convenzionale. Gli elementi base che compongono i sistemi di registrazione comprendono elettrodi con mezzi di conduzione, amplificatori e filtri, un convertitore analogico - digitale e un dispositivo di registrazione. In Figura 1.3 sono rappresentate le componenti principali di un sistema di registrazione EEG.

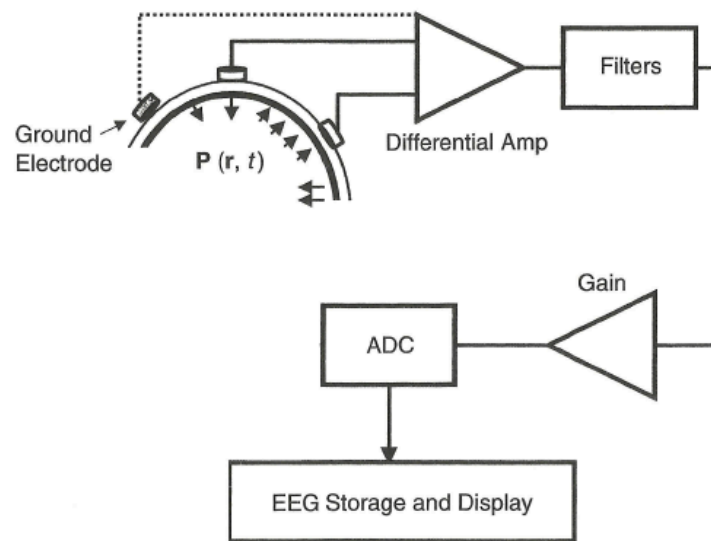


Figura 1.3: Schema generale di, acquisizione di un elettroencefalogramma [6]

La scelta degli elettrodi impiegati nell'acquisizione rappresenta una caratteristica fondamentale per la qualità dei dati ottenuti. Spesso gli elettrodi sono in oro o argento e possono essere di diverse forme: a disco, placchette fissate mediante una cuffia ad aghi ipodermici inseriti sottocute o elettrodi a base di soluzione salina. Gli elettrodi sono collegati a un amplificatore differenziale con alta impedenza di ingresso e con rapporto di reiezione di modo comune. Lo scopo di questi amplificatori è quello di amplificare il voltaggio rilevato dalla differenza di potenziale tra l'elettrodo attivo e quello di riferimento (dell'ordine dei μV) di circa 1000 volte per poter visualizzare il segnale. Per ridurre gli artefatti, il segnale viene filtrato, successivamente, con un filtro analogico passa alto e uno passa basso con frequenze di taglio a 0.5-1 Hz e 35-70 Hz rispettivamente. Per filtrare le componenti spettrali dovute dalla rete a 50 Hz viene utilizzato un filtro *notch*. Il segnale viene ulteriormente amplificato attraverso un amplificatore a guadagno prima di essere digitalizzato per mezzo di un convertitore *ADC*, memorizzato e visualizzato [6].

Le differenti modalità di disposizione delle *derivazioni* (registrazione da ciascuna coppia di elettrodi) costituiscono i cosiddetti *montaggi* e conferiscono una diversa chiave di lettura al segnale EEG visualizzato. Nel *montaggio bipolare*, ciascun elettrodo rappresenta la differenza tra due elettrodi adiacenti; nel *montaggio referenziale* ciascun elettrodo rappresenta invece la differenza tra un certo elettrodo e uno di riferimento che può essere in linea mediana o sull'orecchio. Il *montaggio a riferimento medio* prevede che tutti gli output degli amplificatori siano sommati e mediati e che tale segnale medio sia poi usato come canale di riferimento per le misurazioni. Infine, nel *montaggio laplaciano* il segnale proveniente da ciascun elettrodo rappresenta la differenza tra l'elettrodo considerato e la media ponderata degli elettrodi circostanti [8].

Nell'EEG convenzionale la registrazione è ottenuta applicando elettrodi sullo scalpo usando un gel conduttore, di solito dopo aver adeguatamente preparato la superficie dello scalpo con una leggera abrasione per ridurre l'impedenza elettrodo-scalpo. Ciascun elettrodo è collegato a un singolo filo. Il posizionamento degli elettrodi sullo scalpo segue le direttive specificate dal *sistema internazionale 10-20* che assicura una denominazione coerente degli elettrodi tra i vari studi. 10 e 20 indicano il valore percentuale della distanza dai quattro siti di repere anatomici: *inion*, *nasion* e i *meati acustici esterni* (Figura 1.4). Nella maggior parte delle applicazioni sono usati 19 elettrodi più uno di riferimento a massa con configurazione tipicamente bipolare.

L'EEG convenzionale, come accennato precedentemente, non permette una corretta localizzazione delle sorgenti corticali. La bassa risoluzione spaziale del segnale è dovuta sia all'alta resistività del cranio e dei tessuti cerebrali, che distorce la distribuzione spaziale delle sorgenti elettriche corticali agendo da filtro passa basso spaziale; sia al basso rapporto segnale rumore dei dati. Tale distorsione è incrementata dalle orecchie e dalle cavità oculari che rappresentano percorsi di deviazione per le correnti intracraniche [9].

generatori corticali. Per queste ragioni, l'aggiunta di più elettrodi non è sufficiente di per sé a portare un miglioramento significativo della risoluzione spaziale nella registrazione EEG.

1.2 SSVEP: Potenziali Evocati Visivi Steady State [10]

1.2.1 Fondamenti

I potenziali sensoriali evocati (Sensory Evoked Potentials SEPs) sono potenziali elettrici registrati dal sistema nervoso centrale umano o animale (tipicamente tramite EEG) mentre si stimolano gli organi sensoriali; sono distinti dai potenziali spontanei (EEG di background), che sono misurati senza stimolazione. Al contrario dei potenziali evento correlati (Event Related Potentials ERP) i SEP sono phased locked allo stimolo. Perciò, possono essere potenziati utilizzando tecniche di averaging su un numero elevato di prove. Possono essere interpretati come la riorganizzazione delle oscillazioni spontanee del cervello in risposta a stimoli. Esiti visibili dei SEP possono essere osservati anche sulla singola prova. Il meccanismo che soggiace alla formazione dei SEP quando il segnale è sottoposto ad averaging è materia di discussione.

Tre principali teorie sono in competizione per l'interpretazione su cosa costituisca un SEP: semplici effetti additivi di cambiamenti che si manifestano ad ogni prova, un azzeramento temporaneo della fase dell'attività in corso o una traslazione del valore di riferimento dell'attività corrente.

In seguito al presentarsi degli stimoli visivi, i SEP, denominati potenziali visivi evocati (Visually Evoked Potentials VEPs), possono essere registrati nelle aree visive. Diversi tipi di stimoli possono scatenare VEP; gli stimoli più comuni sono i flash e pattern di stimolazione.

Un VEP flash è ottenuto usando come stimolo una luce lampeggiante, mentre una stimolazione pattern corrisponde all'uso di uno stimolo invertito (pattern invertito), o alla presenza/assenza di uno stimolo (pattern ON-OFF VEP); solitamente lo stimolo consiste in una scacchiera. Questi, appaiono come una successione di forme d'onda:

- I Flash VEP evidenziano una maggiore variabilità inter-soggetto rispetto a VEP generati da pattern e mostrano una lieve asimmetria intraoculare. Consistono in una serie di onde negative e positive; le componenti più robuste sono i picchi N2 (90 *ms*) e P2 (120 *ms*).
- I pattern invertiti hanno una variabilità più bassa della forma d'onda e della latenza del picco sia intra-soggetto sia sulla popolazione. Questo VEP è costituito dalle componenti N75, P100 e N135;
- I pattern ON/OFF: appaiono più variabili rispetto al pattern invertito. Questi VEP presentano tre picchi principali: C1 (positivo, 75 *ms*), C2 (negativo, 125 *ms*) e C3 (positivo, 150 *ms*).

1.2.2 VEP e il percorso visivo

Il sistema visivo ha un'architettura complessa; è costituito da diversi percorsi che trasportano aspetti di ciò che vediamo, per esempio, la forma, il movimento, il colore, ecc. Fino a poco tempo fa, la ricerca si è concentrata su due vie principali: il percorso parvo-cellulare (PC), che si origina dalle cellule dei gangli retinali P, e il percorso magno-cellulare (MC), che prendono origine dalle cellule dei gangli retinali M. In accordo a questa teoria classica, il percorso MC è implicato nella detezione del movimento e della profondità, mentre il percorso PC è coinvolto nella detezione del contrasto spaziale e del colore, con una propagazione più lenta rispetto al percorso MC; queste vie sono associate a specifiche funzioni che portano alla via del “what” ($V1 \rightarrow V3 \rightarrow V4 \rightarrow IT$) e del “where” ($V1 \rightarrow V2 \rightarrow MT \rightarrow STS/PP$). Tuttavia, questa semplice rappresentazione è stata di recente raffinata.

Prima di tutto, sono state scoperte di recente nuove mappe visive nell'uomo ($V3A\&B$, $IPS-0$ to 4 , $LO-1\&2$, $VO1\&2$), tutte situate nella parte posteriore della corteccia (area occipitale); sono organizzate in cluster foveali. Il significato funzionale di queste aree è tutt'ora da esplorare. Per di più, la loro anatomia di base, incluse le connessioni laterali, le connessioni a monte e a valle, devono ancora essere completamente esplorate allo scopo di collegare le loro proprietà funzionali a quelle topografiche. In aggiunta alle nuove mappe scoperte, si dovrebbe includere un terzo percorso nella teoria: il percorso koniocellulare (KC), che ha origine dalle cellule gangliari retinali bistratificate. Deve essere considerato come una via indipendente nei primati umani e non umani. Di conseguenza il sistema completo ha tre vie principali parallele: MC, PC, e KC. I tre cammini hanno origine dalla retina, attraversano il nucleo genicolato laterale (NGL) ed infine arrivano all'area visiva $V1$. Funzionalmente i tre percorsi nascono da coni sensibili a lunghezze d'onda corte (short S), medie (medium M) e

lunghe (long L). Il percorso KC è omologo al percorso visivo del gatto, dove i coni che rilevano le onde corte (S) sono specificamente associati alla via koniocellulare e alla percezione del colore. Il percorso relativo ai coni di tipo S è filogeneticamente più antico ed è presente in molti mammiferi. Questi tre percorsi hanno specifici ruoli funzionali.

- La via MC è acromatica e reagisce a stimoli spaziali a basso contrasto, in particolare a stimoli in movimento; porta informazioni sulla profondità. Nella retina, ha origine dai coni M e L e dalle cellule gangliari M;
- Il percorso PC risponde sia a stimoli ad alto contrasto spaziale, sia a stimoli spettrali (forma e colori) e porta le informazioni relative ai colori rosso/verdi. Il segnale rosso/verde proveniente dai coni di tipo L e di tipo M è integrato dalle cellule gangliari retinali di tipo P.
- Il percorso KC è sensibile a stimoli di tipo spettrale e porta informazioni relative ai colori blu/giallo. Il segnale blu/giallo proveniente dai coni S è integrato dalle cellule bistratificate.

Il flusso ventrale è alimentato dalle cellule KC e PC, mentre il flusso dorsale è alimentato dalle cellule MC. Questo sembrerebbe ad oggi lo scenario più probabile; comunque dato che questi ruoli funzionali sono ancora in discussione, questa recente teoria potrebbe evolvere ancora nel prossimo futuro per incorporare nuove scoperte e osservazioni.

Le tre vie giocano un ruolo chiave nella formazione dei VEP a livello corticale. Identificare il ruolo di queste tre vie nella formazione di entrambi gli stati, transitorio e a regime, è di conseguenza cruciale. Il contributo delle vie PC e MC possono essere attivate dipendentemente dallo stimolo. Segnali cromatici isoluminati rosso/verde stimolano preferibilmente la via PC, mentre segnali con 100% di contrasto di luminanza stimolano sia la via PC che la MC.

Conseguentemente, si stimola la via KC con segnali cromatici isoluminati blu/gialli.

Un approccio alternativo è stato suggerito da McKeefry; la via PC assunta corrispondente a cellule toniche, genera la prima risposta armonica (in aggiunta ad alcuni contributi alla seconda armonica), mentre la via MC assunta in corrispondenza delle cellule fasiche contribuisce solo alla seconda risposta armonica. Secondo questa teoria, una misura selettiva dell'attività MC potrebbe essere ottenuta concentrandosi sulla seconda risposta armonica nello schema ON-OFF VEP. Questo approccio, comunque, non è sufficientemente supportato da evidenze empiriche. Di conseguenza, la seconda risposta armonica in VEP's si dovrebbe usare con cautela, per valutare l'attività magnocellulare. Per esempio questo criterio della seconda armonica è stato utilizzato in studi recenti per identificare l'attività di MC in SSVEP e VEP ma con stimoli modulati in controfase invece del pattern VEP on-off.

1.2.3 Definizioni: VEP transitorio vs SSVEP

I VEP suscitati da brevi stimoli sono solitamente risposte transitorie del sistema visivo. Potenziali evocati transitori sono risposte del sistema sotto studio a cambiamenti improvvisi nell'input. Circa 40 anni fa Regan iniziò a fare esperimenti con stimoli lunghi (TRAINS), consistenti in luce monocromatica modulata sinusoidalmente. Questi stimoli produssero un VEP stabile di piccola ampiezza, che poteva essere estratto mediando su diverse prove. Le onde EEG furono definite come potenziale evocato visivo a regime del sistema visivo umano. I SSVEP possono essere trovati anche in modelli animali. Il VEP

transitorio è utile per determinare il tempo che impiega uno stimolo a viaggiare dall'occhio alla corteccia occipitale. Questa misura può essere utilizzata per la diagnostica in oftalmologia e per alcune applicazioni cliniche (come la sclerosi multipla) possono inoltre avere applicazioni utili per lo studio delle aree funzionali visive del cervello. Secondo la definizione originale, i potenziali a regime sono da distinguere dai potenziali transitori, perché la loro componente di frequenza discreta rimane praticamente costante sia in fase che in ampiezza per un lungo periodo di tempo. Questa caratteristica "costante" non è una osservazione nel dominio del tempo. Ciò che rimane costante è la distribuzione spettrale (nel dominio delle frequenze), non l'ampiezza dell'EEG nel dominio del tempo: SSVEP contengono oscillazioni periodiche stazionarie; di conseguenza, la distribuzione d'ampiezza del contenuto spettrale di SSVEP con caratteristici picchi (SSVEP), rimane stabile nel tempo. Siccome queste caratteristiche sono costanti, alcune applicazioni possono derivare dalle proprietà di propagazione dell'SSVEP. Una prima differenza fra queste due risposte evocate è quindi il loro range di applicazione. In aggiunta, i SSVEP sono meno suscettibili ad artefatti prodotti da battiti, movimenti oculari e rumore elettromiografico. I VEP transitori sono tipicamente usati solo per studiare il sistema visivo, mentre il range di applicazione dei SSVEP è maggiore, da neuroscienze cognitive e neuroscienze cliniche ad applicazioni neuro-ingegneristiche con BCI.

Per motivi di chiarezza, ora si illustra la differenza tra VEP transitorio e SSVEP. La forma della risposta nel dominio del tempo non è sufficiente per distinguere l'SSVEP dal VEP transitorio, invece la risposta spettrale nel dominio della frequenza è critica. La risposta transitoria è una complessa risposta in risonanza ad uno stimolo. Quando lo stimolo è ripetuto questa risposta complessa dovrebbe corrispondentemente essere ripetuta; questa risposta combinata potrebbe diventare organizzata (con oscillazioni periodiche stazionarie) o disorganizzata (senza oscillazioni periodiche stazionarie) e qui sta la differenza fra VEP transitorio e SSVEP. Se la risposta è organizzata, il potenziale evocato potrebbe

contenere componenti periodiche con picchi osservabili nello spettro di frequenza; attraverso i ripetitivi stimoli lampeggianti il contenuto spettrale del segnale rimarrà prettamente lo stesso (conterrà lo stesso picco armonico in relazione di fase con lo stimolo). In aggiunta la fase di latenza media del SSVEP sarà proporzionale alla frequenza di stimolo.

In contrasto, se la risposta è disorganizzata, la fase e l'ampiezza della componente di frequenza varieranno; lo spettro di frequenza non avrà componenti SSVEP stazionari distinti. Questo significa che la presenza o l'assenza dell'SSVEP può essere stimata solo dalle caratteristiche del segnale (specialmente in basse frequenze) nel caso di SSVEP, il sistema raggiunge uno stato a regime dinamico durante tutta la durata del periodo di registrazione, senza mai ritornare al suo stato di riposo, mentre per VEP transitori il sistema ritorna al suo stato di riposo dopo ogni breve stimolo. Si noti che si dovrebbe usare una finestra sufficientemente larga per calcolare la rappresentazione di Fourier.

1.2.4 Esperimenti: VEP transitorio vs SSVEP

In precedenza è stato sottolineato in accordo con la teoria di Regan, che il transitorio iniziale dovuto all'adattamento scompare dall'SSVEP dopo una stimolazione sufficientemente lunga. Come risultato, l'SSVEP può essere quantificato e riprodotto in maniera relativamente facile; contrariamente è difficile da descrivere, quantificare e riprodurre il VEP transitorio. Siccome lo spettro di Fourier dei SSVEP mostra modelli stazionari distinti, le misure base della potenza

di Fourier possono confermare la presenza di SSVEP. Inoltre, la media dei potenziali evocati attraverso le prove, porta a segnali periodici (non necessariamente sinusoidali, dovuti alle armoniche). Tecniche di elaborazione del segnale più sofisticate, in particolare la rappresentazione wavelet, ci consentono di visualizzare i SSVEP nel piano tempo-frequenza. Gli SSVEP possono essere provocati da diversi tipi di stimoli visivi. L'idea di fondo è sempre la stessa: un battito o uno stimolo visivo di movimento ad una frequenza costante (la frequenza dello stimolo) provoca una risposta nel cervello alla stessa frequenza e le sue armoniche pari (frequenza SSVEP = Frequenza dello stimolo + le sue armoniche pari). Notare che questo comportamento denota una non linearità del sistema visivo: la trasformata di Fourier di un'onda quadra contiene armoniche dispari, ma la sua trasformazione dal sistema visivo, contiene invece armoniche pari.

Di seguito è riportata una lista di alcuni differenti tipi di stimoli:

- Diodi luce emittenti lampeggianti;
- Luce lampeggiante;
- Scacchiera con due colori alternativamente invertiti (bianchi e neri o checks colorati);
- Immagine lampeggiante;
- Rumore gaussiano sfarfallante;
- Luce lampeggiante con gradazione lampeggiante;
- Cerchi lampeggianti e rotanti;
- Griglia in movimento.

I differenti stimoli elencati nella lista sopra possono evocare differenti risposte nel sistema visivo, dipendente dalle loro caratteristiche. La via MC risponde preferibilmente a stimoli con colori neutrali e luminanza diffusa, che ha basso contrasto e griglia di grandi dimensioni, e che inverte il contrasto ad un ritmo veloce; le vie PC e KC rispondono preferenzialmente a stimoli che

contengono colori differenti, hanno alto contrasto e griglia di piccole dimensioni, esibiscono una variazione spaziale significativa in luminanza. Perciò, scacchiere bianco-nere ad alte frequenze temporali e a basse frequenze spaziali provocano SSVEP preferibilmente nella via MC; contrariamente, scacchiere colorate con basse frequenze temporali e alte frequenze spaziali stimolano la PC (rosso/verde) e la KC (blu/giallo) più della MC. Le vie PC e KC sono preferenzialmente stimulate da stimoli strutturati; essi sono maggiormente attivati da componenti a bassa frequenza. La via MC è sollecitata preferenzialmente da stimoli visivi non strutturati, lampeggianti nei range di frequenza bassi, medi e alti. Questo potrebbe spiegare il motivo per cui stimoli a scacchiera non rendono forti risposte a frequenze superiori di 8 **Hz**, mentre stimoli non strutturati lo fanno.

Alcuni scienziati definiscono i confini del SSVEP nel range 3-50Hz. Comunque, questa definizione è problematica per due ragioni: primo, stimoli lampeggianti a frequenze molto basse minori o uguali di 3 **Hz** possono provocare SSVEP; secondo, recenti ricerche hanno mostrato che le armoniche di SSVEP e l'SSVEP possono essere generati fino ad 80 **Hz**; questo sfida il confine dei SSVEP (50 **Hz**). Questi rapporti sono in linea con la teoria che relaziona il VEP ad un reset della fase. Secondo questa teoria gli SSVEP non sono generati dalla modulazione di ampiezza, mentre sono dovuti principalmente all'allineamento della fase dell'EEG di background: una stimolazione ritmica costante induce a reset la fase dell'EEG e, come conseguenza, la media di diverse prove rivelano un potenziale evocato alla frequenza dello stimolo. Se questa teoria è valida, il range di frequenza di SSVEP è limitato alla vie PC, MC o KC a seconda del tipo di stimolo.

È possibile dare una definizione generale di SSVEP indipendentemente dal meccanismo che lo ha generato: gli SSVEP sono risposte evocate indotte dal flickering di stimoli visivi. Gli SSVEP sono periodici, con uno spettro stazionario distinto che mostra caratteristici picchi SSVEP, stabili nel tempo.

I SSVEP sono osservabili meglio nel dominio della frequenza o nel dominio del tempo-frequenza.

La maggior parte delle passate ricerche su SSVEP si concentravano su stimolazioni a singola frequenza; è naturale investigare inizialmente su stimolazioni a singola frequenza prima di considerare procedure di stimolazione più complesse. Comunque è noto che la combinazione di due onde sinusoidali lampeggianti a frequenze f_1 e f_2 produce una risposta alla frequenza media, insieme con risposte a f_1 e f_2 . Recentemente, ricerche più dettagliate sono state condotte su questi stimoli combinati. Per esempio, uno studio considera un quadrato lampeggiante generato dalla combinazione di luci verdi e rosse, con frequenze di flickering differenti per i due colori; ciò ha dimostrato che questo stimolo ha indotto un accoppiamento di fase fra le due componenti di frequenza nell'SSVEP registrato. Similarmente, un pattern costituito da due stimoli, lampeggianti a diverse frequenze, ha indotto una risposta spettrale con picchi alle frequenze individuali, in aggiunta a picchi ad altre frequenze; i picchi di quest'ultimo sono causati dall'accoppiamento quadratico fra i due stimoli di frequenza e le loro armoniche. L'esatto meccanismo che sta sotto a questo processo di accoppiamento è ad oggi ancora sconosciuto; inoltre, schemi ancora più complessi, quelli con più di due frequenze o con segnali che stimolano differenti vie, vale a dire PC, KC o MC non sono ancora stati presi in considerazione.

Gli SSVEP possono essere registrati in vari modi: registrazioni invasive (potenziale di campo locale, EcoG) registrazioni cuoio capelluto (EEG e MEG) ed imaging (fMRI, PET, SPECT). Gli SSVEP possono inoltre essere registrati direttamente al livello retinale; appaiono in elettroretinogrammi. Spesso per fare ricerche sugli SSVEP è stata usata l'EEG grazie ai suoi bassi costi e alla buona risoluzione temporale.

1.2.5 Sorgenti di SSVEP: teorie ed esperimenti

I componenti in media e alta frequenza in SSVEP sono stati attribuiti a due diverse, ma potenzialmente sovrapponibili, fonti della corteccia visiva, locale principalmente in V1. Al contrario, componenti a bassa frequenza di SSVEP potrebbero essere generati non solo da regioni corticali. Nel campo della distribuzione topografica, diversi autori hanno suggerito che gli SSVEP a bassa frequenza si formano nelle strutture subcorticali, a livello retinale o nei tratti di fibre. Recentemente, una risposta precoce a bassa frequenza è stata osservata nel LGN, registrata da elettrodi impiantati in un paziente umano. Questo conferma che gli SSVEP si formano nelle aree corticali.

Gli studi più recenti sulla stimolazione visiva a bassa frequenza, comunque, hanno analizzato gli SSVEP nella sola corteccia. Allo stato dell'arte, solamente uno studio di fonti SSVEP su immagini di cervello ha riportato fonti SSVEP extra corticali di attivazione, più specificatamente, nel cervelletto. Secondo molti studi l'area occipitale della corteccia genera SSVEP. Come è stato già sottolineato, sembra che siano coinvolte anche aree extra corticali. Inoltre, parti differenti della corteccia, oltre all'area occipitale, potrebbero giocare un ruolo importante nella formazione di SSVEP: uno studio recente con fMRI ha riportato SSVEP di 3-5 **Hz** anche nella corteccia frontale mediale. Quindi, sembra che gli SSVEP's si verifichino in una rete corticale occipitofrontale di grande scala, che potrebbe essere funzionalmente connessa a certe strutture extra corticali. È importante rendersi conto che risultati ottenuti con metodi di imaging e di registrazione diversi, dovrebbero essere comparati con grande cautela. L'EEG ha buona risoluzione temporale, mentre PET e fMRI hanno bassa risoluzione

temporale ma risoluzione spaziale molto migliore. Quindi è più affidabile comparare i risultati ottenuti con fMRI e PET con tomografia a bassa risoluzione, la quale dovrebbe fornire risultati più comparabili rispetto le altre tecniche di valutazione di sorgenti (perché estrarrà dipoli distribuiti localmente, simili a quelli osservati con fMRI o PET). In sintesi, l'unico consenso generale tra questi studi differenti è che la fonte di SSVEP più forte è situata nella corteccia striata, ma questa sorgente non sembra essere interamente responsabile della generazione degli SSVEP.

Tre teorie sono state portate avanti per spiegare la complessità della distribuzione di SSVEP:

1. Si possono distinguere le sorgenti in localmente e ampiamente distribuite; quest'ultime sorgenti potrebbero spiegare l'ampia distribuzione nel cuoio capelluto di SSVEP's osservati in EEG.

Teoria 1: gli SSVEP si originano nella corteccia visiva primaria e si propagano grazie alla attività combinata delle sorgenti localmente ed ampiamente distribuite.

2. È stato suggerito che gli aspetti topografici (potenza e fase) degli SSVEP potrebbero essere spiegati da dipoli isolati che vengono attivati sequenzialmente nel tempo. **Teoria 2:** gli SSVEP sono generati da un numero finito di dipoli elettrici che sono attivati sequenzialmente nel tempo, partendo con un dipolo situato in V1.
3. Anche se i dipoli isolati costituiscono l'attività più forte, non potrebbero descrivere in modo sufficiente la complessa distribuzione della attività elettrica nel cervello. Questa distribuzione potrebbe essere spiegata da un modello d'onda viaggiante, nella quale onde corticali stazionarie e viaggianti potrebbero propagarsi dalle aree visive alle aree non visive nella corteccia.

Teoria 3: VEP si formano nella corteccia visuale primaria, e si propagano ad altre aree del cervello attraverso onde corticali stazionarie.

Queste teorie hanno in comune il solo fatto che gli SSVEP si propagano partendo dalla corteccia visiva primaria e coinvolgono più di un dipolo a singola sorgente; la sorgente a dipolo singolo nel lobo occipitale non è adeguata a spiegare i pattern spaziali dinamici della grandezza e della fase degli SSVEP.

La teoria 3 è più specifica per il fenomeno EEG e non si relaziona bene per le osservazioni fMRI/PET.

La teoria 1 cerca di integrare entrambe le osservazioni di EEG e fMRI/PET.

Conseguentemente, queste tre teorie non sono necessariamente contraddittorie, corrispondono a differenti prospettive. La teoria 1 ha un vantaggio e un maggiore potere esplicativo per quanto riguarda tutti i dati disponibili; colma il divario fra le differenze in scala di EEG e fMRI/PET. Questa teoria introduce una distinzione fra dinamiche cerebrali locali e a lunga distanza che è un comune aspetto dei modelli EEG, ma non è classico dei modelli fMRI/PET. Conseguentemente, ulteriori evidenze daranno necessarie per confermare questa teoria.

1.2.6 Componenti SSVEP

Nonostante anni di studi, il complesso meccanismo dietro gli SSVEP non è ancora pienamente compreso. Di solito si distinguono tre differenti componenti negli SSVEP:

- Una componente primaria nel range delle alte frequenze (gamma 25-60 **Hz** range), con piccola variabilità interindividuale, e latenza tipica sui 20-60 **ms**. Risposte precoci a 10 **ms** sono state riportate e la latenza di questa componente sembra crescere progressivamente con l'età.
- Una componente secondaria nel range 12-25 **Hz**, con variabilità interindividuale più alta e latenza all'incirca di 85-120 **ms**.
- Una after discharge ritmica al di sotto di 15 **Hz**, con latenza di 135-350 **ms** (di media 250 **ms**); questa componente ci mette svariati cicli per raggiungere lo stato a regime dopo l'inizio di una stimolazione e non si stoppa immediatamente quando lo stimolo viene spento.

Per ogni componente sono state osservate topografie differenti, e la topografia di fase degli SSVEP ha mostrato considerevoli variabilità interindividuali. Le tre componenti potrebbero apparire dopo una media, ma potrebbero essere estratte in modo migliore tramite l'analisi di Fourier. Selezionando la frequenza di stimolo, è possibile evocare determinati componenti SSVEP più di altri, e quindi, si possono generare potenziali evocati differenti; lo SSVEP contiene sinusoide alle frequenze fondamentali ed armoniche dello stimolo.

1.2.7 Applicazioni nelle neuroscienze cognitive

Le risposte agli SSVEP hanno uno spettro stabile ed un elevato SNR. Di conseguenza sono utili strumenti per studiare i processi neurali che stanno alla

base dell'attività ritmica del cervello; sono stati applicati in un ampio spettro di indagini cliniche e cognitive.

Nelle neuroscienze cognitive, gli SSVEP sono spesso utilizzati come una “sonda topografica”. È utilizzato come una tag in frequenza associato ad un task visivo. La frequenza di propagazione dei SSVEP durante il task rispetto alle condizioni di controllo viene utilizzata indirettamente per stimare la propagazione del segnale EEG correlato a quel task. Questo metodo, utilizzato principalmente nella banda alfa, è usato per osservare la correlazione di processi cognitivi, principalmente nella corteccia prefrontale.

1.2.7.1 Attenzione visiva

Il meccanismo cognitivo meglio studiato con gli SSVEP è l'attenzione visiva. Le risposte evocate visivamente sono sostanzialmente aumentate se lo stimolo lampeggiante cade all'interno dell'area relativa all'attenzione spaziale. Questo effetto è più accentuato nell'emisfero frontale destro rispetto a quello sinistro; tuttavia questa asimmetria emisferica scompare dopo una presentazione duratura degli stimoli.

1.2.7.2 Competizione Binoculare

Un altro paradigma ben noto per studiare la percezione visiva conscia è la competizione binoculare; due bersagli visivi incongruenti sono presentati contemporaneamente, un target in una metà del campo visivo, un altro nell'altra metà. Purtroppo, la competizione binoculare è un fenomeno alquanto soggettivo; solo il soggetto sa quando la propria percezione cambia. Tuttavia è stato mostrato

che il target osservato può essere identificato con paradigmi SSVEP: per esempio, se due target sono dei led lampeggianti a diverse frequenze, l'ampiezza della risposta SSVEP relativa al bersaglio preso in considerazione è potenziata. Questa è la ragione per cui si suggerisce che la competizione binoculare possa essere combinata con successo agli SSVEP; i due target lampeggiano a due frequenze diverse e gli SSVEP sono generati alla frequenza del bersaglio che viene percepito soggettivamente.

1.2.7.3 Applicazioni nelle neuroscienze cliniche

L'applicazione dei VEP è uno strumento diagnostico e di studio non nuovo nelle neuroscienze cliniche. In particolare, i SSVEP sono stati usati in modo intensivo nell'investigazione clinica. In questo contesto, la stimolazione SSVEP è denominata "stimolazione luminosa intermittente", e gli SSVEP sono denominati "photic driving". I photic driving sono una sottoclasse di SSVEP suscitati con flash o fotostimolatori. Negli studi clinici, gli SSVEP sono utilizzati per studiare dinamiche patologiche cerebrali.

1.2.7.4 Epilessia

SSVEP possono fare insorgere risposte epilettiche a stimoli luminosi e colorati. Il caso più famoso è avvenuto in Giappone durante la messa in onda di un episodio dei Pokemon nel 1997, dove immagini lampeggianti blu e rosse hanno indotto una fotoepilessia massiva e emicrania fotosensibile, con più di 12000 bambini che mostravano segni e sintomi della malattia. Nel contesto

clinico, l'epilessia fotosensibile è solitamente studiata utilizzando uno specifico tipo di SSVEP, chiamato "photic driving", suscitato con flash VEP ripetuti (chiamati anche stimoli luminosi intermittenti), prodotti con fotostimolatori o lampade stroboscopiche. Mentre i SSVEP sono prodotti, si cercano le onde che preludono all'epilessia o le onde iperfasiche nel tracciato EEG. La procedura è discutibile dal fatto che può indurre una crisi epilettica durante il test, e si è indagato su altri approcci per modernizzare la procedura, per esempio utilizzando SSVEP a bassa frequenza.

La risposta epilettica è sensibile alla luminosità: un'alta luminosità aumenta il rischio di epilessia. Mentre gli attacchi epilettici possono essere scatenati da stimoli a partire da 20 cd/m^2 , i fotostimolatori tipici possono produrre stimoli lampeggianti con una luminosità maggiore ai 100 cd/m^2 da 1 a 60 **Hz**. Risposte di tipo epilettico sono state riportate a partire da 3 **Hz** fino ad 84 **Hz**, ma con predominanza tra i 10 e 20 **Hz**. Il colore dello stimolo ha un forte impatto sull'effetto della risposta, e stimoli colorati utilizzando rossi a bassa luminosità possono indurre risposte epilettiche. Forti risposte agli stimoli cromatici alle basse frequenze indicano di conseguenza un forte ruolo dei percorsi PC (rosso/verde, con preferenza per le basse frequenze) e KC (blu\giallo), con probabile preferenza per le basse frequenze nell'epilessia fotosensibile. Ciò potrebbe indicare un'interazione patologica tra i percorsi PC e KC nella genesi dell'epilessia fotosensibile.

1.2.7.5 SSVEP per le Brain Computer Interfaces (BCIs)

Le Brain Computer Interfaces (BCIs) puntano a fornire una comunicazione diretta e non muscolare tra il cervello umano e il computer; il computer può essere connesso a diversi dispositivi che interagiscono con l'ambiente, per esempio motori e attuatori che controllano sedie a rotelle. I sistemi BCI devono essere in grado di reagire con sufficiente rapidità ai comandi umani, e di conseguenza, i segnali utilizzati come input per i sistemi BCI devono avere una buona risoluzione temporale. I sistemi BCI utilizzano quindi i tracciati encefalografici (invasivi o non invasivi). Nel corso degli ultimi vent'anni sono stati fatti i progressi più interessanti nel campo delle BCI. Le caratteristiche dei segnali cerebrali, come quelle estratte da segnali generati da trigger interni od esterni (potenziali evento correlati) o da sincronizzazioni e desincronizzazioni evento correlate, possono essere utilizzate per codificare i vari comandi degli utenti; per questa ragione sono considerati come blocchi elementari per i sistemi BCI.

L'idea base di utilizzare gli SSVEP per guidare una BCI risale a più di trent'anni fa, quando fu illustrato, nel 1979, un antesignano di SSVEP-BCI da Regan. La BCI proposta in quello studio utilizzava un feedback in catena chiusa per controllare il contrasto di uno stimolo strutturato direttamente dall'ampiezza dell'SSVEP.

L'applicazione degli SSVEP alle BCI è stata introdotta successivamente da Cheng e Gao, nel 1999. La BCI elabora un segnale proveniente da un EEG non invasivo per muovere un cursore 2D; il segnale era registrato dalla regione occipitale della corteccia mentre il soggetto si concentrava su quattro quadrati lampeggianti a frequenze diverse. Ogni frequenza codificava un comando (alto, basso, destra, sinistra). L'idea più generale consiste nel codificare i comandi del

soggetto attraverso stimoli luminosi che inducono SSVEP a frequenze diverse; l'utilizzatore sceglie uno dei comandi concentrando l'attenzione su uno stimolo lampeggiante e, analizzando l'SSVEP generato, la BCI cerca di interpretare quale stimolo ha selezionato l'utente. Seguendo questo principio, Middendorf sviluppò un sistema BCI non invasivo basato su SSVEP, in cui 2 pulsanti lampeggiati erano mostrati sul monitor di un PC e l'utilizzatore poteva scegliere un pulsante semplicemente fissando uno di essi.

1.2.7.6 Sviluppi per le BCI

Nell'applicazione degli SSVEP alle BCI, i segnali EEG sono registrati nelle regioni occipitali mentre il soggetto osserva uno stimolo luminoso lampeggiante a frequenze differenti, ognuna delle quali codifica per un diverso comando. Rilevando le frequenze nel segnale EEG registrato, si possono ottenere comandi per pilotare un computer. I sistemi BCI basati su SSVEP devono essere studiati da due diversi punti di vista: ricerca applicata (ingegneria) e ricerca di base (neuroscienze). Le BCI sono state studiate, fino ad ora, principalmente dal punto di vista della ricerca applicata. I due problemi chiave in questo contesto sono la stabilità e le prestazioni.; un sistema BCI è stabile se commette pochi errori (ha cioè un basso tasso di errore) e le sue prestazioni sono buone se fornisce comandi veloci.

Il primo problema (stabilità) può essere risolto tramite signal-processing, ma probabilmente nuovi paradigmi potranno potenziare l'SNR degli SSVEPs.

Il secondo problema (prestazioni) dipende in gran parte dal design dell'esperimento. In altri termini, il design sperimentale e i paradigmi sono

cruciali se si vogliono sviluppare BCI efficienti. basate sugli SSVEP Senza una migliore comprensione dei meccanismi che stanno alla base degli SSVEP, il design sperimentale non sarà significativamente migliorato. Di conseguenza, gli studi di base delle BCI stanno diventando necessari per fornire risultati controllati e riproducibili.

Per esempio, è necessario uno studio robusto sugli effetti di ogni parametro sperimentale: dimensioni dello stimolo, distanza dallo stimolo, luminosità, affaticamento mentale ecc. Senza questo studio, parametri non controllati possono distorcere i risultati. Questi studi sono complessi a causa della loro natura interdisciplinare, coinvolgendo sia aspetti di natura biologica sia aspetti ingegneristici.. Come ultima cosa, l'applicazione in termini pratici delle BCI basate su SSVEP richiede l'ottimizzazione di due parametri aggiuntivi: il costo e l'ergonomia del sistema : la BCI deve avere un costo ragionevole ed essere “user friendly”.

1.3 tDCS: stimolazione transcranica in corrente continua [11]

La polarizzazione della corteccia cerebrale mediante stimolazione con corrente continua, *DCS: direct current stimulation*, è stata inizialmente introdotta in studi animali intorno al 1950. In generale, tali studi hanno evidenziato che la *polarizzazione positiva (stimolazione anodica)* aumenta l'eccitabilità della corteccia cerebrale nel ratto e nel gatto, aumentando la frequenza di scarica

neuronale spontanea e l'ampiezza dei potenziali evocati, mentre la *polarizzazione negativa (stimolazione catodica)* ne riduce l'eccitabilità. Tali effetti condizionanti della DCS sono stati attribuiti alle modificazioni del potenziale di membrana a riposo dei neuroni corticali. Tuttavia, se la DCS viene applicata per un tempo uguale o superiore a 5 minuti può determinare modificazioni durature della frequenza media di scarica neuronale, che permangono fino ad alcune ore dopo l'interruzione dell'erogazione della corrente. Tali effetti a lungo termine non sono semplicemente legati a modificazioni prolungate del potenziale di membrana o ad un'eccitazione ricorrente, poiché non vengono aboliti dall'interruzione intermittente dell'attività elettrica cerebrale mediante ipotermia. Il *potenziamento a lungo termine (LTP)* e la *depressione a lungo termine (LTD)* dell'attività sinaptica sono pertanto stati proposti per spiegare gli effetti della DCS. Recentemente la DCS è stata reintrodotta per la *stimolazione transcranica, tDCS transcranial direct current stimulation*, non invasiva della corteccia cerebrale nell'uomo.

1.3.1 Parametri biofisici dell'applicazione della tDCS nell'uomo

I parametri di stimolazione che si possono settare durante una seduta di stimolazione sono:

- Intensità
- Montaggio degli elettrodi
- Modalità

- Durata
- Numero di stimolazioni

La tDCS nell'uomo si basa sull'applicazione di una corrente elettrica costante di bassa intensità (1-2 ***mA***) attraverso due elettrodi di superficie. L'elettrodo di stimolazione è localizzato sull'area target, mentre l'elettrodo di riferimento può essere posizionato sullo scalpo (stimolazione bipolare–referenza cefalica) o su un'altra parte del corpo, generalmente su un braccio, (stimolazione monopolare–referenza extracefalica). Tali elettrodi, inseriti all'interno di spugne imbevute di soluzione salina, hanno una dimensione che in genere non è inferiore a 5×5 ***cm***. La focalità della stimolazione dipende dalla dimensione degli elettrodi e dalla modalità di stimolazione (con referenza cefalica o con referenza extracefalica). Infatti, la stimolazione con referenze cefalica potrebbe stimolare anche le aree remote sottostanti l'elettrodo di riferimento, con una diminuzione della focalità. La focalità diminuisce inoltre con l'aumentare delle dimensioni degli elettrodi, in quanto, con elettrodi di grandi dimensioni si potrebbero stimolare oltre all'area target anche le aree corticali adiacenti. Per aumentare la focalità della stimolazione è possibile diminuire le dimensioni degli elettrodi rispettando però sempre i limiti di sicurezza per i pazienti attraverso un controllo della densità di corrente erogata e della densità di carica.

In prima approssimazione, la densità di corrente (***i***) nell'area cerebrale situata immediatamente al di sotto dell'elettrodo può essere calcolata attraverso il rapporto tra intensità della corrente erogata (***I***) e area dell'elettrodo (***A***), ovvero:

$$\mathbf{i} = \frac{\mathbf{I}}{\mathbf{A}} \quad (1.1)$$

La carica totale erogata (***Q***) dipende invece dalla durata della stimolazione e la densità di carica (***q***) può essere espressa mediante il rapporto tra carica totale erogata e area dell'elettrodo (***A***), ovvero:

$$q = \frac{Q}{A} \quad (1.2)$$

In conformità a tale assunto, la riduzione dell'area dell'elettrodo rende la tDCS più focale, mentre l'aumento della stessa può renderla funzionalmente inefficace.

Un altro aspetto da tenere in considerazione prima di programmare un trattamento con tDCS è *l'orientazione del campo elettrico* che è generalmente definito dalla posizione e dalla polarità degli elettrodi. In particolare viene definito *anodo* l'elettrodo carico positivamente e il *catodo* l'elettrodo carico negativamente. Il flusso di corrente va quindi dal catodo verso l'anodo provocando una depolarizzazione, con aumento dell'eccitabilità, nella zona sottostante l'anodo e una iperpolarizzazione, con diminuzione dell'eccitabilità, nella zona sottostante il catodo.

Ci possono essere tre modalità di stimolazione: *anodica*, *catodica* e *sham*.

- La **stimolazione anodica** si ha quando l'anodo si trova sulla zona di interesse e il catodo fa da riferimento.
- La **stimolazione catodica** si ha quando il catodo si trova sulla zona di interesse e l'anodo fa da riferimento.
- La stimolazione **sham** è una stimolazione placebo.

La tDCS, non sembra indurre direttamente una consistente depolarizzazione neuronale, bensì modulare l'attivazione dei canali del sodio e del calcio voltaggio-dipendenti e dei recettori NMDA (N-Metil D-Aspartato).

I suddetti parametri biofisici possono essere utilizzati per comparare l'efficacia di protocolli con differente intensità e durata di stimolazione. Inoltre è

possibile, servendosi anche di informazioni ricavate da studi animali, stabilire dei parametri di stimolazione, in termini di intensità e durata della stessa, che consentano di utilizzare in sicurezza la tDCS nell'uomo: in un recente studio di “safety”, Liebetanz e coll., (2009) hanno confermato, analizzando gli effetti lesionali di differenti intensità di corrente e di carica nel cervello del ratto, che la soglia per la determinazione di un danno cerebrale macroscopico è di due ordini di grandezza maggiore rispetto ai parametri di stimolazione comunemente utilizzati nell'uomo ($I = 1\text{-}2\text{ mA}$; durata = $5\text{-}20\text{ min}$; densità massima di carica = $100\text{-}1000\text{ C/m}^2$). In figura è riportata la zona di lavoro consigliata per avere una stimolazione efficace e quella di pericolo.

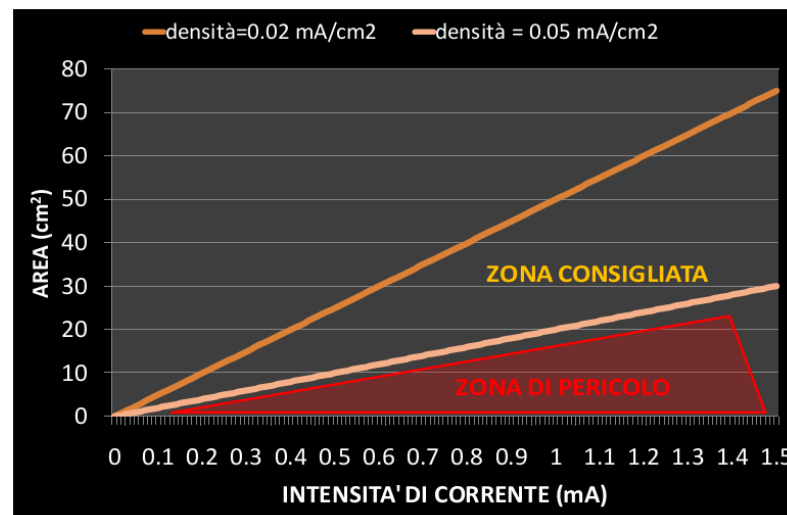


Figura 1.CCC: Curva Area-Intensità di corrente.

1.3.2 Applicazioni della tDCS sul cervello umano

Gli effetti della tDCS nell'uomo possono essere indagati combinando la tDCS con lo studio dell'eccitabilità corticale mediante *Stimolazione Magnetica Transcranica*, TMS, con tecniche di neuroimaging funzionali, oppure valutandone l'effetto a livello comportamentale.

Si è osservato che la tDCS, erogata mediante i due elettrodi posti uno sull'area *motoria primaria* (M1) e l'altro sul *polo frontale controlaterale*, induce modificazioni durature dell'eccitabilità corticospinale, rilevabili con la registrazione dei *Potenziali Evocati Motori* (MEP) ottenuti stimolando M1 mediante TMS. La direzione di tali modificazioni dipende dalla polarità della tDCS: l'eccitabilità aumenta se l'anodo viene posizionato su M1 e il catodo sul polo frontale, stimolazione anodica, mentre si riduce se gli elettrodi vengono posizionati in maniera inversa, stimolazione catodica.

Analogamente a quanto osservato negli animali, questi cambiamenti dell'eccitabilità corticale persistono oltre il tempo della stimolazione se la tDCS viene erogata per più di 3 minuti e per almeno un'ora se la tDCS viene erogata per più di 10 minuti.

Vari studi condotti sull'uomo hanno, inoltre, valutato la possibilità di indurre modificazioni di tipo cognitivo mediante tDCS, indagando in particolar modo i processi di apprendimento e la memoria di lavoro. Questi studi si sono avvalsi principalmente della stimolazione della corteccia visiva, parietale e prefrontale; si è anche evidenziato una facilitazione dell'apprendimento motorio implicito in seguito a stimolazione di M1. Analogamente a quanto avvenuto negli ultimi anni per la *stimolazione magnetica ripetitiva* (rTMS), anche la tDCS è oggetto di numerosi studi volti a valutarne le potenzialità terapeutiche in patologie

neurologiche e psichiatriche. Sebbene ad oggi sia stato condotto un numero minore di studi clinici sulla tDCS rispetto alla rTMS, un elemento a favore della tDCS è rappresentato dal suo minor costo e maggiore facilità di somministrazione. La tDCS, infine, sembra avere enormi potenzialità, possibilmente in combinazione con le tradizionali tecniche neuroriabilitative, nel recupero dalla disabilità conseguente al danno cerebrale. Varie evidenze suggeriscono che, dopo un danno cerebrale, si instauri uno squilibrio di tipo mal adattativo tra i due emisferi cerebrali: l'aumento dell'eccitabilità dell'emisfero sano, privato delle afferenze inibitorie trans-callosali provenienti dall'emisfero leso, costituirebbe un ostacolo al recupero funzionale.

Il razionale dell'uso della stimolazione cerebrale consiste quindi nell'indurre una facilitazione dell'attività neuronale nell'emisfero leso o un'inibizione nell'emisfero controlaterale.

Capitolo 2

Materiali e metodi

La sezione materiale e metodi è suddivisa in due parti: l'esperimento e l'elaborazione dei dati.

La prima punta a descrivere gli aspetti pratici affrontati durante l'esperimento e tratta della configurazione sperimentale sia della stimolazione tDCS sia per quanto riguarda la misura dei SSVEP e gli strumenti utilizzati per evocarli.

La seconda parte descrive il percorso compiuto per estrarre informazione dal tracciato acquisito durante l'esperimento. Dopo il pre-processing e l'elaborazione del segnale nel dominio delle frequenze, verranno introdotti gli strumenti matematici per condurre l'analisi statistica dei dati

2.1 L'esperimento

L'obiettivo di questo lavoro è quello di verificare se la stimolazione transcranica in corrente continua (tDCS) ha effetti a breve e a medio termine sui SSVEP.

In particolare si andranno a studiare i SSVEP che si manifestano in corrispondenza dell'armonica fondamentale, coincidente alla frequenza di stimolazione, e della seconda armonica.

2.1.1 Soggetti

Allo studio hanno partecipato 6 soggetti sani (2 donne, 4 uomini) di età compresa tra i 21 e 51 anni.

2.1.2 tDCS

Una corrente di 1.5 mA è stata erogata attraverso uno stimolatore in corrente continua a batteria (NeuroConn DC stimulator, Fig 2.1) utilizzando una

coppia di elettrodi in silicone conduttivo (anodo e catodo) per una durata di 15 minuti. L'anodo è stato posizionato su Oz, mentre il catodo sul braccio destro.



Figura 2.1 Elettrostimolatore per tDCS NeuroConn

Il catodo utilizzato ha forma rettangolare e dimensioni 5x7 cm. L'anodo è stato appositamente realizzato per meglio adattarsi alle condizioni sperimentali. Dovendo l'anodo essere posizionato tra i due elettrodi EEG O1 e O2 è stato necessario adattare la sua forma con lo scopo di interferire il meno possibile con essi durante la fase di stimolazione anodica e contemporanea registrazione del tracciato elettroencefalografico. Come si può osservare in Figura 2.2 l'elettrodo è stato smussato nella parte centrale, consentendone quindi un corretto posizionamento.

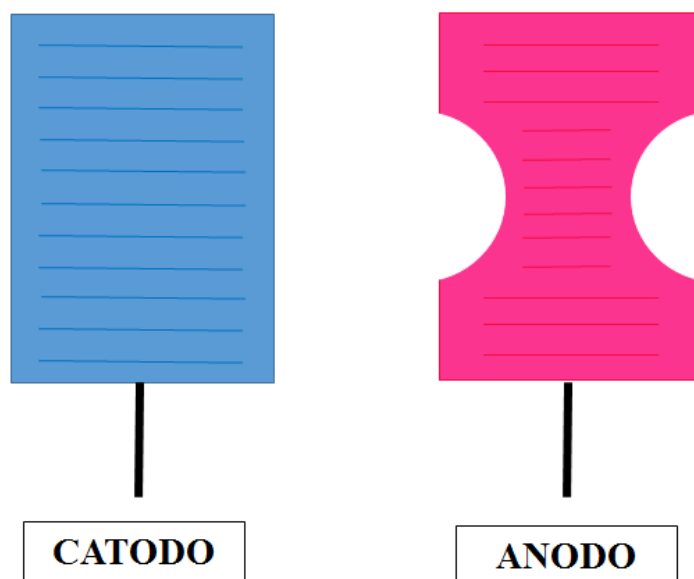


Figura 2.2 Anodo modificato per la stimolazione in Oz e Catodo

E' stato utilizzato un montaggio extracefalico con l'anodo posizionato in Oz e il catodo posizionato sul braccio destro del soggetto. Il montaggio extracefalico permette di aumentare la focalità della stimolazione. Infatti in questo modo si riesce ad attribuire con certezza l'eventuale effetto ottenuto al tipo di stimolazione erogata. Se entrambi gli elettrodi fossero posizionati sullo scalpo non sarebbe più possibile associare in maniera univoca l'effetto al tipo di stimolazione.

I soggetti sono stati stimolati con stimolazione Anodica. La scelta della stimolazione anodica non è casuale. Antal ha studiato gli effetti della stimolazione tDCS applicata in corrispondenza della corteccia occipitale misurando VEP in Oz. Dai suoi risultati è emerso che la stimolazione catodica ha provocato un decremento dell'attività oscillatoria, mentre la stimolazione anodica ha prodotto un aumento, anche se non significativo. In base a ciò l'attenzione è stata diretta alla stimolazione anodica. Avere SSVEP più elevati è una condizione auspicabile

perché porta ad un segnale meglio distinguibile che può essere usato con successo in applicazioni BCI.

La stimolazione Sham è stata utilizzata come controllo. Essa prevede l'erogazione della corrente solo per pochi secondi in modo tale da far avvertire al soggetto la sensazione della stimolazione. Dopo di che la stimolazione si interrompe ma il soggetto non ne è al corrente, in quanto lo stimolatore continua a simulare la stimolazione. Confrontando i risultati ottenuti con la stimolazione anodica e quella sham si può vedere quanto un effetto sia causato realmente dalla stimolazione, piuttosto che dall'effetto placebo.

Di seguito (Tab 2.1) vengono riportati i parametri della stimolazione sham:

PARAMETRI STIMOLAZIONE SHAM	
<i>Fronte di salita (FADE IN)</i>	8 s
<i>Fronte di discesa (FADE OUT)</i>	5 s
<i>Durata</i>	30 s
<i>Intensità della corrente</i>	1,5 mA

Tabella 2.1 Parametri stimolazione sham

Di seguito (Tab 2.2) vengono riportati i parametri della stimolazione anodica

PARAMETRI STIMOLAZIONE ANODICA	
<i>Fronte di salita (FADE IN)</i>	8 s
<i>Fronte di discesa (FADE OUT)</i>	5 s
<i>Durata</i>	900 s
<i>Intensità della corrente</i>	1,5 mA

Tabella 2.2 Parametri stimolazione Anodica

La corretta preparazione degli elettrodi per l'elettrostimolazione è importante per 2 aspetti:

- a) Prima di ogni stimolazione viene effettuato il controllo dell'impedenza di elettrodo: se il valore misurato è superiore ad un valore critico (50 KOhm) l'apparecchiatura emette un segnale di allarme e interrompe la stimolazione.
- b) Se un elettrodo non ha un quantitativo sufficiente di gel, potrebbero verificarsi delle concentrazioni di corrente sulla pelle del soggetto, dando luogo a scottature nelle regioni in cui sono collocati gli elettrodi.

Per questi motivi i due elettrodi sono stati posizionati all'interno di una spugna imbevuta di soluzione salina e cosparsa di gel conduttivo.

Gli elettrodi per la stimolazione con tDCS sono collegati al soggetto per tutta la durata dell'esperimento, che complessivamente dura circa un'ora. Se le spugnette si asciugano, l'impedenza aumenta: è quindi opportuno procedere con nuove somministrazioni di gel.

La scelta di tenere collegato il soggetto all'elettrostimolatore durante tutto l'esperimento, quindi anche quando non viene somministrata corrente, nasce dalla volontà di mantenere il setting sperimentale il più possibile costante durante tutta la prova per rendere i dati confrontabili. In Figura 2.3 è rappresentato il setting durante l'esperimento.



Figura 2.3 Setting Sperimentale

2.1.3 Registrazione dei SSVEP [12]

Gli steady state evoked potential (ssVEP) sono generati dall'area occipitale della corteccia. Al fine di misurarli si è scelto un montaggio bipolare O1-PO7 per il canale 1 (lato sinistro) e O2-PO8 per il canale 2 (lato destro) in accordo con il sistema internazionale 10-20.

Il segnale elettroencefalografico è stato registrato tramite il sistema Neurowave (Khymeia) che utilizza Brainbox ® EEG-1166 come sistema di acquisizione.

Il valore delle impedenze di elettrodo è stato mantenuto al di sotto dei 10 K Ω . A questo fine di è applicato il gel conduttivo tramite una siringa negli elettrodi di interesse (O1, PO7, O2, PO8 e GND). A causa della vicinanza tra O1-PO7 e O2-PO8, l'applicazione del gel conduttivo ha richiesto particolare attenzione: un percorso conduttivo tra gli elettrodi dà luogo ad un cortocircuito che annulla la differenza di potenziale tra questi, annullando di fatto il segnale.

Il controllo delle impedenze è effettuato dal sistema Neurowave, che associa un codice colore al valore delle impedenze di ogni elettrodo.

Il colore di ogni canale indica il livello di impedenza di quel canale verso il canale di massa (Figura 2.4).

CODICE COLORE-IMPEDENZA	
<i>COLORE</i>	<i>IMPEDENZA [kΩ]</i>
<i>ROSSO</i>	200
<i>ARANCIONE</i>	100
<i>GIALLO</i>	50
<i>VERDE CHIARO</i>	10
<i>VERDE SCURO</i>	5

Tabella 2.3 Codice colore-impedenza

L'accuratezza della misura è del $\pm 20\%$.

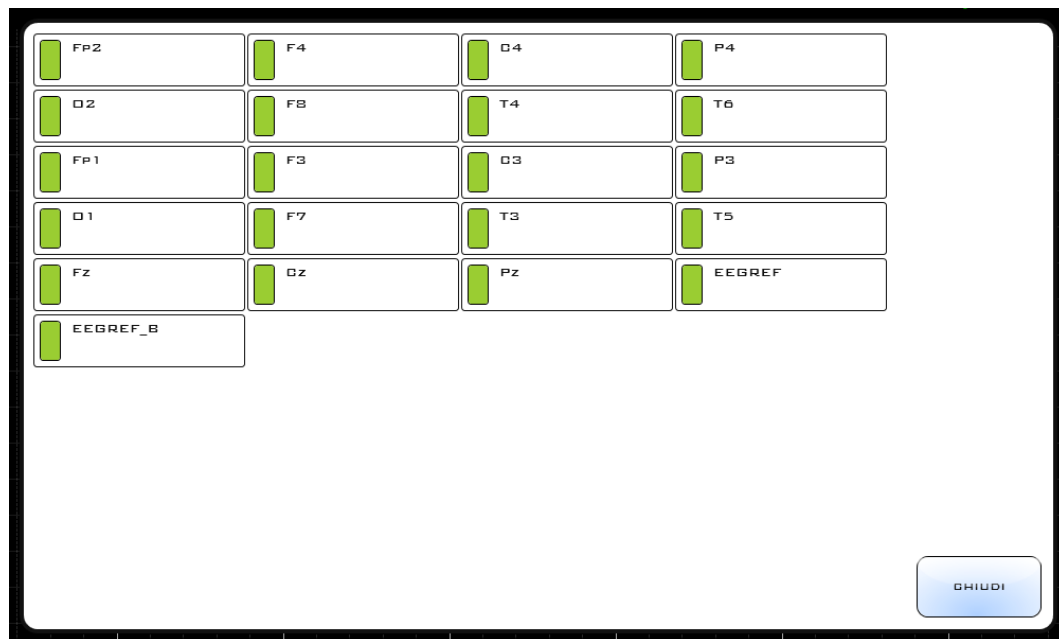


Figura 2.4 Schermata per il controllo di impedenza di elettrodo

Il segnale elettroencefalografico è stato acquisito con una frequenza di campionamento di 128 Hz e sottoposto ad un filtraggio passa banda tra 3-60 Hz, per eliminare le basse e le alte frequenze, e un notch a 50 Hz per eliminare eventuali disturbi di rete.

2.1.4 Protocollo

L'obiettivo di questo lavoro è capire se la stimolazione anodica in corrente continua ha un effetto a breve e medio termine sui SSVEP e se questo effetto è

correlato in qualche maniera al diverso tipo di colore dello stimolo luminoso semplice (un quadrato lampeggiante).

2.1.4.1 La stimolazione luminosa

L'esperimento consiste nell'osservazione di 3 quadrati colorati (3 rossi o 3 gialli) su sfondo nero che lampeggiano in contemporanea a 3 differenti frequenze: 12 Hz (quadrato in alto a sinistra), 15 Hz (quadrato in alto a destra) e 20 Hz (quadrato in basso in posizione centrale) (Figura 2.5) .

Ogni singolo trial (che costituisce l'unità più piccola di ogni sessione) ha una durata di 12 s ed è costituito nel modo seguente:

1. Una freccia indica il quadrato da osservare per una durata di 1 s; in questo lasso di tempo nessun quadrato sta lampeggiando.
2. Tutti e tre i quadrati stanno oscillando alle frequenze impostate per una durata di 7 s (fase di flickering).
3. Terminata la fase di oscillazione, segue un intervallo di tempo di 4 s dove i 3 quadrati sono nuovamente fissi (fase di resting).

Ogni trial viene ripetuto 5 volte per ognuna delle tre frequenze, per una durata complessiva di 3 minuti per ogni sessione.



Figura 2.5 L'applicazione SSVEP Stimulator

2.1.4.2 L'elettrostimolazione

Al fine di indagare gli effetti della stimolazione tDCS sui SSVEP, l'acquisizione del segnale EEG è stata effettuata in 4 condizioni sperimentali differenti:

Baseline: Il soggetto viene sottoposto agli stimoli luminosi in condizioni in assenza di stimolazione tDCS.

- Sham: Durante la stimolazione luminosa il soggetto viene sottoposto ad una stimolazione sham.
- Anodica In concomitanza della stimolazione luminosa viene applicata una corrente continua con polarità anodica per una durata di 15 minuti. In questa fase si vuole osservare la presenza di effetti immediati sul segnale.
- Post Anodica l'obiettivo di questa ultima fase dell'esperimento è quello di verificare se sono presenti effetti sui SSVEP nei 12 minuti successivi al termine della stimolazione anodica.

All'interno di queste quattro condizioni sono effettuate quattro sessioni della durata di 3 minuti, ciascuna utilizzando la stimolazione luminosa descritta nel paragrafo 2.1.3.1. Durante la prima e la terza acquisizione, la stimolazione è effettuata tramite quadrati lampeggianti di colore rosso, mentre nella seconda e quarta acquisizione vengono utilizzati i quadrati gialli (Figura 2.6). Per ogni condizione di stimolazione e per ogni colore vengono acquisiti 10 trial (5+5).

La scelta di alternare per quattro volte i due differenti tipi di stimolazione luminosa (rosso – giallo – rosso – giallo) deriva dal fatto di voler eliminare la dipendenza dal tempo di stimolazione nello studio degli effetti della tDCS.

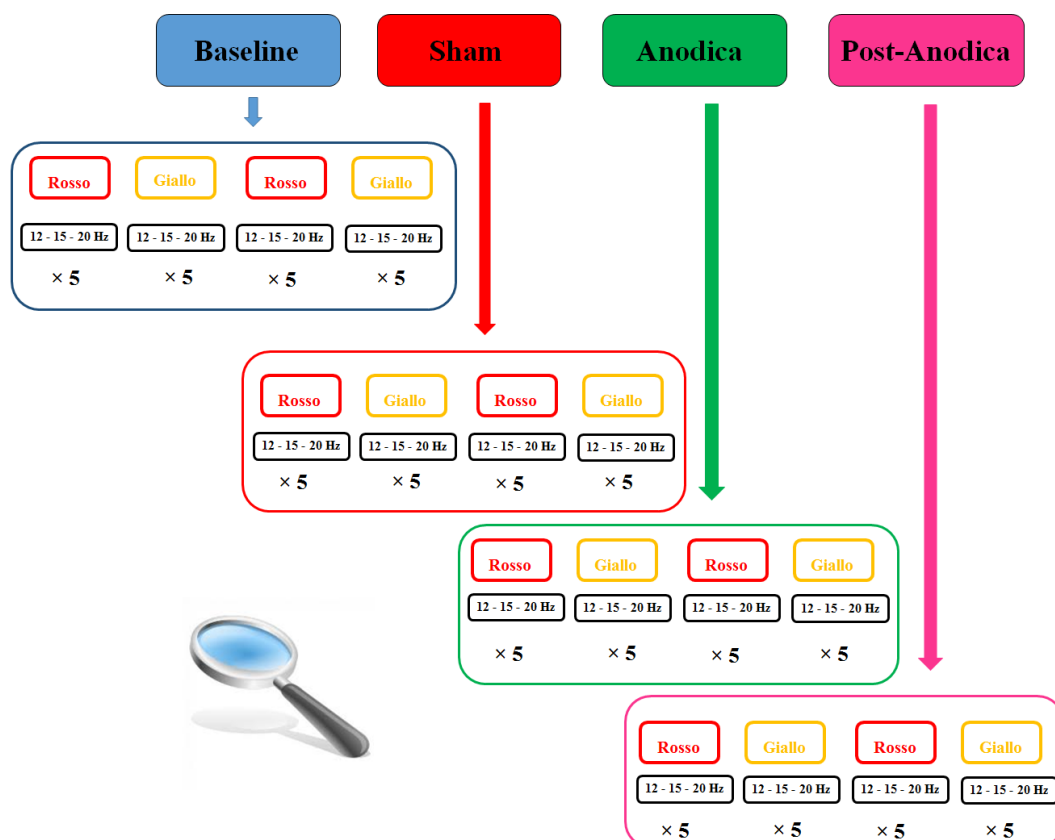


Figura 2.6 Schema del protocollo dell'esperimento

2.1.5 OpenVibe [13]

La stimolazione visiva tramite quadrati lampeggianti è possibile grazie all'applicazione *openvibe-ssvep-demo-training* presente all'interno di OpenVibe (versione 0.15 <http://openvibe.inria.fr/>), un software open source nato per progettare, testare ed utilizzare Brain Computer Interfaces (BCI). Le BCI “sono

sistemi di comunicazione che permettono all'utilizzatore di inviare comandi al calcolatore per mezzo della sola attività cerebrale".

OpenVibe offre una libreria di scenari già implementati per l'utilizzo di diversi tipi di BCI. La programmazione tramite OpenVibe avviene attraverso l'utilizzo di box configurabili: gli algoritmi che stanno alla base di ogni singola elaborazione sono trasparenti e modificabili in base alle esigenze dell'utilizzatore. In questo elaborato si utilizzano due degli scenari implementati per realizzare un sistema BCI basata sugli SSVEP.

I due scenari sono stati opportunamente adattati per riprodurre il protocollo descritto e sono stati definiti ssvep-configuration e ssvep-visual stimulation.

2.1.5.1 Lo scenario ssvep-configuration

Lo scenario ssvep-configuration (vedi Figura 2.9 per lo schema a blocchi) è lo scenario che consente di configurare la prova. In esso è possibile configurare:

- 1. Periferal Settings:** questa box si occupa della gestione del monitor su cui viene lanciata l'applicazione. Il parametro configurabile da questa box è la refresh rate del monitor. Sul notebook utilizzato (Toshiba Satellite) la refresh rate è di 60 Hz (Figura 2.7). Questo parametro è fondamentale per l'esperimento, perché è dalla refresh rate che dipende la frequenza a cui i quadrati possono oscillare. In particolare l'applicazione è in grado di far lampeggiare i quadrati a frequenze ottenute dalla divisione per un numero intero ($12\text{ Hz}=60/5$, $15\text{ Hz}=60/4$, $20\text{ Hz}=60/3$)

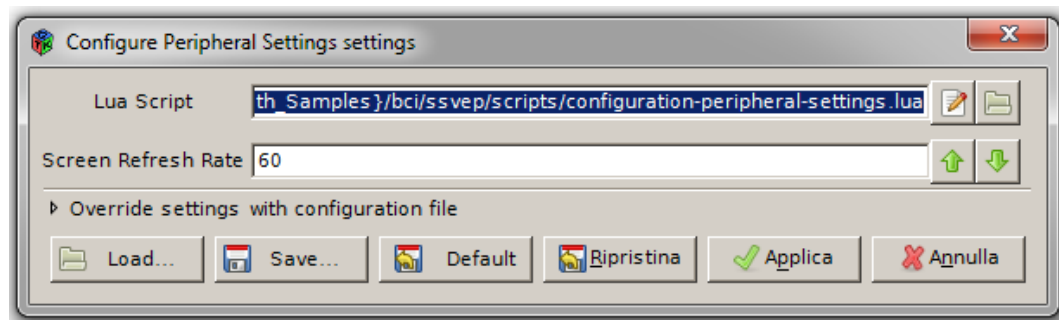


Figura 2.7 Finestra Peripheral Settings

2. Experiment settings: permette di impostare i parametri generici dell'esperimento (Figura 2.8). Questi sono:

- Target Light/Dark Color
- Stimulation Frequencies
- Processing Epoch Duration
- Processing Epoch Interval
- Processing Frequency Tolerance

I parametri *Target Light/Dark Color* permettono di impostare i colori degli stimoli. In particolare i colori che sono stati utilizzati sono: il rosso (100,0,0 in RGB) e il giallo (100,100,0).

Stimulation Frequencies permettono di impostare le frequenze di oscillazione dei quadrati. Nel nostro studio esse sono: 12 Hz, 15 Hz e 20 Hz.

Gli altri tre parametri non vengono utilizzati e pertanto vengono lasciati i valori di default (0,5 s per la Processing Epoch Duration, 0,1 s per il Processing Epoch Interval e 0,250 Hz per la Processing Frequency Tolerance)

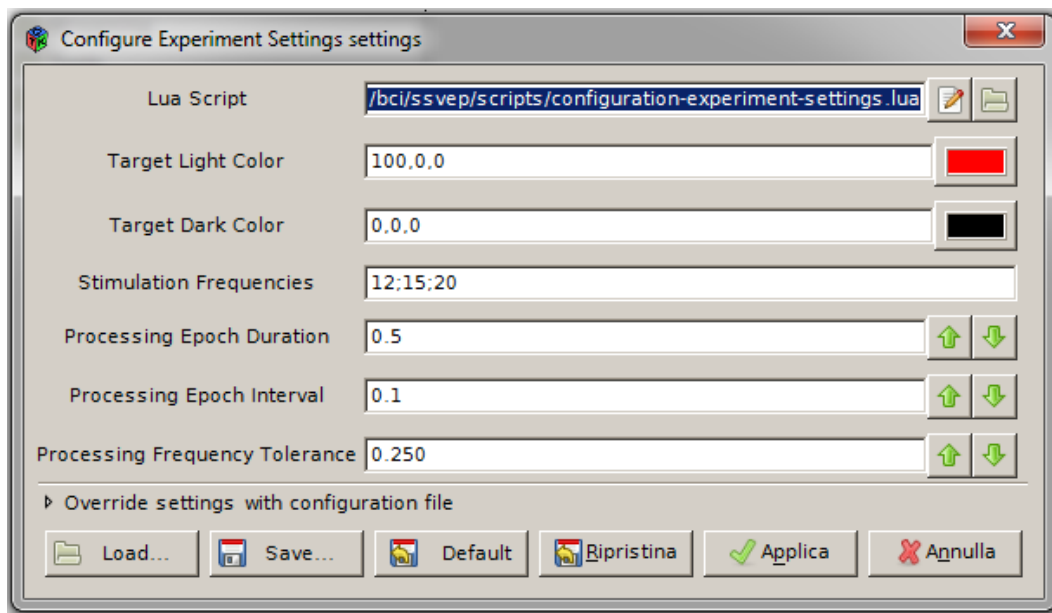


Figura 2.8 Finestra Experiment Settings

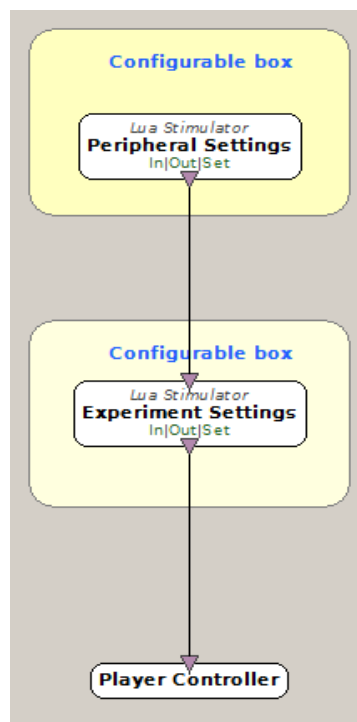


Figura 2.9: Schema a blocchi dello scenario SSVEP-configuration

2.1.5.2 Lo scenario ssvep-visual stimulation

Questo scenario si occupa della gestione della stimolazione luminosa. Il box **SSVEP training controller** (figura 2.10) permette di configurare i parametri di stimolazione:

1. **Goal Sequence:** stabilisce l'ordine con cui il soggetto va ad osservare i quadrati. Per questo esperimento la sequenza è:

1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3

Ciò significa che si andrà a fissare il quadrato che lampeggia a 12 Hz (target 1), a 15 Hz (target 2) ed infine a 20 Hz (target 3) in successione per cinque volte per ogni sessione.

2. **Break Duration:** permette di stabilire la durata dell'intervallo di tempo in cui il soggetto non fissa alcun target. È fissato a 4 s.
3. **Flickering Delay:** è il tempo che intercorre dalla comparsa della freccia che indica il bersaglio da fissare e l'inizio del flickering. È settato a 1 s
4. **Training Target Size:** consente di impostare le dimensioni dei rettangoli o quadrati che flickereranno sullo schermo. Tali dimensioni sono espresse come una percentuale della dimensione dello schermo su cui si esegue l'applicazione. Per questo esperimento sono impostati a 0,3 (base) e 0,3 (altezza)
5. **Training target position:** sono le coordinate dei centri dei quadrati. I valori inseriti sono:

TARGET	Coordinata del centro
<i>Target 0</i> (reso invisibile)	(0,0 ; 0,0)
<i>Target 1</i> (in alto a sx)	(-0.85 ; 0,6)
<i>Target 2</i> (in alto a dx)	(+0.85 ; 0,6)
<i>Target 3</i> (in basso al centro)	(0,0 ; -0.6)

Tabella 2.4 Coordinate centri quadrati

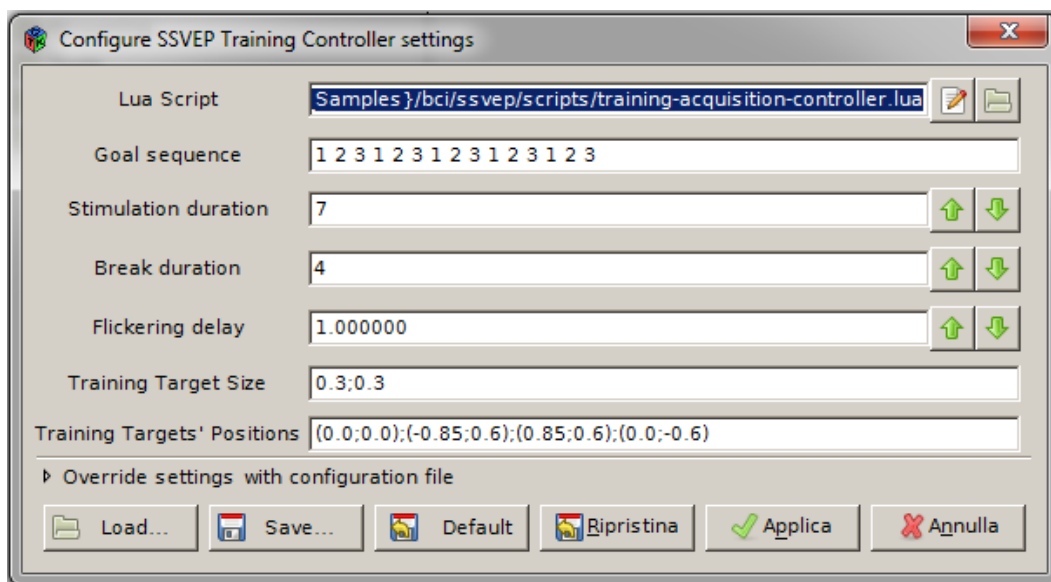
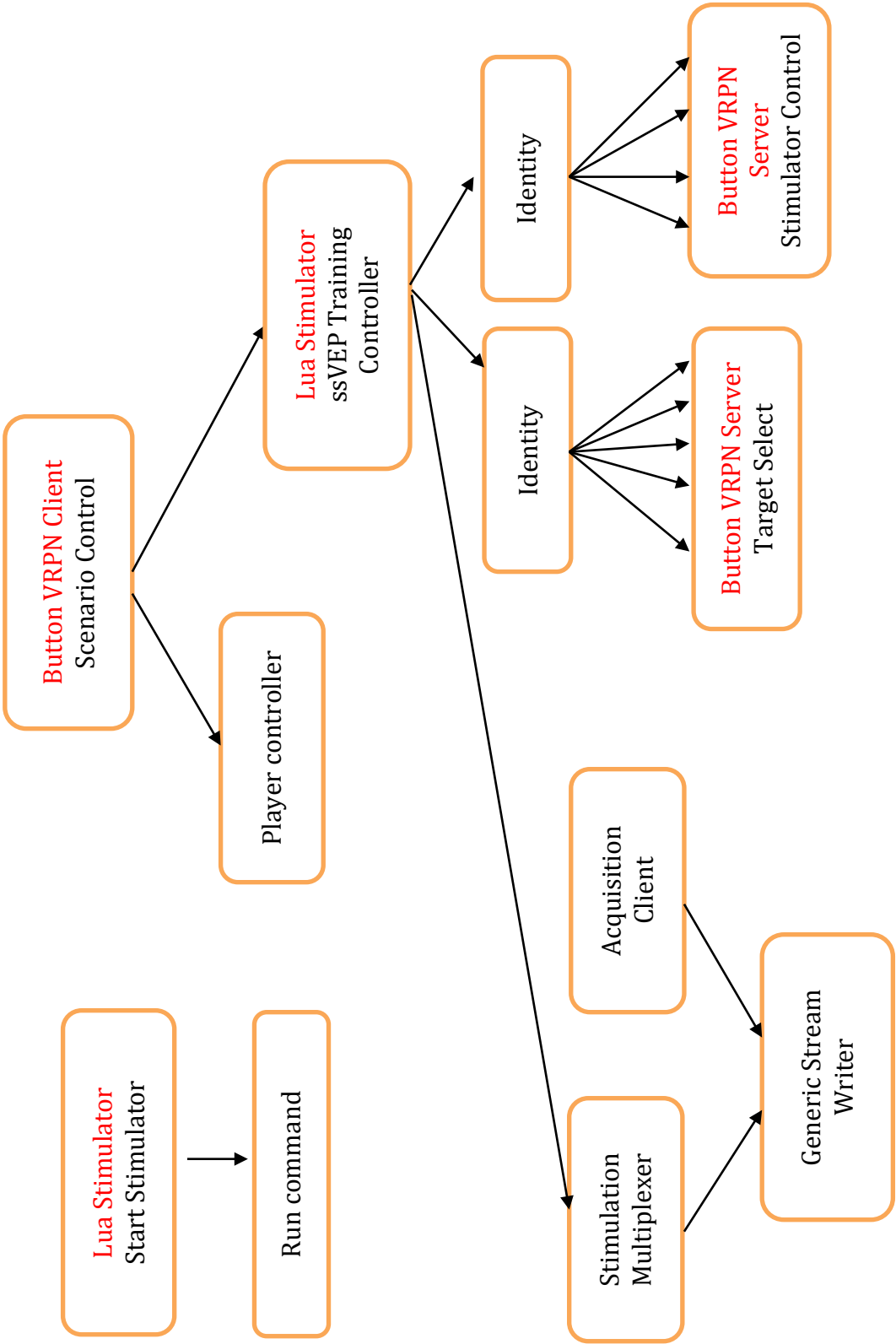


Figura 2.10 Finestra di configurazione dell'applicazione SSVEP Training Controller



2.2 Elaborazione dei dati

In questo paragrafo vengono presentati i metodi con cui sono stati analizzati i dati acquisiti mediante il protocollo descritto nella sezione precedente. L'elaborazione si articola in due fasi fondamentali:

- 1) Pre-processing e Analisi Esplorativa
- 2) Analisi statistica

La prima fase si occupa del pre-condizionamento e dell'elaborazione del segnale acquisito per estrarre indici quantitativi quali la PSD e la Potenza del segnale.

La seconda fase si occupa della ricerca di eventuali effetti significativi rispetto a modalità di stimolazione elettrica, colore e frequenza di stimolazione.

2.2.1 Pre-processing e Analisi Esplorativa [14]

Il tracciato elettroencefalografico è stato acquisito ad una frequenza di campionamento di 128 Hz. e sottoposto ad un filtraggio passa banda tra 3 e 60 Hz ed elimina banda centrato a 50 Hz e larghezza di banda di 4 Hz. $BW=[48-52]$ Hz, tramite un filtro IIR di ordine 14.

Acquisito il segnale, si estraggono i dati relativi ai 7 s di effettivo flickering delle figure. Per fare ciò è di fondamentale importanza conoscere la

sequenza del protocollo ed aver effettuato una buona sincronizzazione tra l'inizio della stimolazione luminosa e quello della registrazione del tracciato EEG. Le porzioni del segnale si possono classificare in 4 tipologie:

- a) Stimolazione a 12 Hz
- b) Stimolazione a 15 Hz
- c) Stimolazione a 20 Hz
- d) Riposo

Per ogni frequenza, ogni stimolazione, ogni colore e ogni sessione si dispone quindi di un struttura dati organizzata in matrici $n \times m \times k$, dove:

$n= 896 (7 \times 128)$	è il numero di campioni contenuti in 7 s
$m=2$	è il numero di canali
$k= 5$	è il numero di trial acquisiti per ogni frequenza

La struttura dati che contiene il tracciato relativo alla fase di resting è invece una matrice di dimensioni $i \times m \times j$, dove:

$i= 512 (4 \times 128)$	è il numero di campioni contenuti in 4 s
$m=2$	è il numero di canali
$j=14$	è il numero di intervalli tra un trial e l'altro

Dal dominio dei tempi si passa al dominio delle frequenze attraverso una fast fourier transform:

$$\tilde{X}[l] = \sum_{k=0}^{M-1} x[k] e^{-j2\pi \frac{l}{N} k} \quad \text{con } l = [0 \cdots (N - 1)] \quad (2.1)$$

Dove m è il numero di campioni che costituiscono il segnale x (cioè la sua durata) e N è il numero di righe con cui viene rappresentato lo spettro del segnale nel dominio delle frequenze.

Il segnale viene trasformato utilizzando una finestra temporale di 7 s per ciascuna delle frequenze di flickering (12 Hz, 15 Hz e 20 Hz). La risoluzione frequenziale del segnale è di $\frac{1}{7}$ Hz = 0,14286 Hz e ogni trial ha uno spettro bilatero costituito da 897 campioni (nfft=897).

Le trasformate di Fourier relative agli intervalli di tempo in cui i 3 quadrati non lampeggiano e il soggetto può riposarsi sono portate alla stessa risoluzione frequenziale delle fft dei trial tramite zero padding effettuato in automatico dal comando `fft()` di MatLab.

Lo spettro di densità di potenza di ogni singolo trial (Power Spectrum Density, PSD) è stimato applicando il metodo del periodogramma:

$$P(j2\pi F) = \frac{T_c}{N} |X(e^{j2\pi F_k T_c})|^2 \quad (2.2)$$

Il periodogramma è uno stimatore polarizzato poiché stima la densità di potenza per un periodo di tempo limitato attraverso una finestra rettangolare. Inoltre ha varianza alta perché stima la potenza su una sola ripetizione. La stima migliora quando si effettua la media su un numero maggiore di prove.

Un aspetto importante per effettuare un corretto confronto tra le prove condotte da più soggetti è la normalizzazione dei dati. La normalizzazione viene effettuata utilizzando le porzioni di resting in condizioni di baseline.

Per ogni colore, ogni frequenza, ogni condizione di stimolazione, la PSD estratta da ogni trial viene normalizzata dividendo per la PSD estratta dalla fase di resting della baseline. Da questo punto in poi la PSD normalizzata verrà indicata dall'acronimo PSDn.

L'analisi esplorativa consiste nell'osservazione delle PSDn relative al canale 1 e al canale 2 di ogni singolo trial, per ogni tipo di colore, frequenza e stimolazione.

Lo scopo di questa fase è quella di escludere le prove rumorose e artefattuali che potrebbero compromettere l'analisi statistica.

La necessità di questo step nasce dalla criticità dovuta alla stimolazione anodica. Gli elettrodi di stimolazione tDCS e gli elettrodi per la misurazione dei potenziali sullo scalpo si trovano ad una distanza molto ravvicinata (canale 1: PO7-O1, canale 2 PO8-O2, anodo in Oz). Anche se l'anodo è stato concepito con una forma tale da interferire il meno possibile, gli elettrodi di misurazione dei potenziali hanno comunque subito un effetto dovuto alla corrente di stimolazioni. L'analisi esplorativa ha messo in evidenza l'impossibilità di condurre l'analisi statistica sui trial relativi alla condizione anodica, posto che si sono rivelati troppo rumorosi per essere considerati significativi.

Selezionati i trial, si è proceduto con la stima della potenza negli intervalli delle frequenze di interesse. La banda su cui stimare la potenza è centrata a 12 Hz, 15 Hz, 20 Hz \pm 0,5714 Hz per la prima armonica, 24 Hz, 30 Hz e 40 Hz \pm 0,5714 Hz per la seconda armonica. Ciò consiste nel considerare 4 campioni prima e 4 campioni dopo il picco (4x0.1429 Hz). La potenza contenuta nella banda è l'integrale della PSD calcolato nell'intervallo di frequenze considerato.

$$Pow = \int_{f-\Delta f}^{f+\Delta f} P(j2\pi F) dF \quad (2.3)$$

L'integrale è calcolato numericamente attraverso il metodo dei trapezi (comando trapz() di MatLab)..

La potenza stimata per ciascuna prova è la grandezza su cui verrà effettuata l'analisi statistica.

2.2.2 Analisi statistica

L'analisi statistica permette di evidenziare eventuali differenze significative rispetto alle potenze estratte nell'intorno delle 3 frequenze di flickering. In particolare metterà in evidenza eventuali differenze significative tra le potenze provenienti da condizioni sperimentali differenti. Se dall'analisi statistica emergerà che i dati provengono da popolazioni diverse si andrà ad indagare in che modo queste sono differenti.

L'indagine viene condotta sulla potenza misurata sulla prima e sulla seconda armonica, confrontando uno alla volta i 3 fattori che caratterizzano l'esperimento: stimolazione tDCS, frequenze e colori.

2.2.2.1 I test di gaussianità dei dati [15, 16]

Il primo passo da fare è testare la gaussianità dei dati. I valori delle potenze da testare sono quelli che non sono stati scartati durante l'analisi esplorativa

I dati vengono sottoposti al test di ipotesi di Lilliefors. Il test di Lilliefors è un test a 2 code che misura il livello di adattamento (goodness of fit) di un campione ad una distribuzione normale di cui non si conoscono i parametri μ e σ .

Il test statistico è:

$$\max |F(x) - G(x)| \quad (2.4)$$

Dove $F(x)$ è la funzione di distribuzione di probabilità cumulativa (CDF) stimata attraverso il campione e $G(x)$ è la CDF della distribuzione di probabilità normale standard.

L'importanza di verificare se i dati sono distribuiti normalmente è di fondamentale importanza perché la validità o meno di questa ipotesi determina i test statistici da utilizzare. Dato che l'ipotesi di normalità dei dati viene a mancare si è dovuto ricorrere all'utilizzo di test non parametrici, in particolare il test di Friedman.

2.2.2.2 Il test di Friedman [17,18]

Il test di Friedman è un test non parametrico basato sui ranghi (dall'inglese Rank, posizione in graduatoria). Si applica quando cadono le ipotesi su cui si basa l'ANOVA (in questo caso è caduta l'ipotesi di normalità dei dati).

Le assunzioni su cui si basa il test di Friedman sono le seguenti;

1. I dati provengono dalla stessa distribuzione continua
2. Tutte le osservazioni sono tra loro mutualmente indipendenti

Il test di Friedman testa gli effetti sulle colonne; il suo utilizzo è appropriato quando le colonne rappresentano i trattamenti che si vogliono studiare e le righe rappresentano effetti da tenere in considerazione ma che non sono di interesse.

Il test di Friedman assume un modello nella forma:

$$x_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk} \quad (2.5)$$

Dove

x_{ijk}	rappresenta la singola misura
μ	rappresenta la posizione complessiva
α_i	rappresenta l'effetto della colonna
β_j	rappresenta l'effetto della riga
ε_{ijk}	rappresenta l'errore commesso sulla singola misura

Questo test ordina i dati all'interno di ogni livello di B (righe) e testa le differenze tra i livelli di A.

Il test di Friedman restituisce il p-value relativo all'ipotesi nulla $H_0 \alpha_i = 0$, cioè che non ci sia differenza tra i livelli di A (cioè tra le colonne). Un valore piccolo del p-value suggerisce che almeno una colonna presenti una mediana significativamente differente rispetto alle altre. Le scelte del p-value critico per determinare se il risultato sia statisticamente significativo dipende da quanto si desidera rendere restrittivo il test. In questo lavoro si è deciso di utilizzare un p-value standard del 5%, ($\alpha=0.05$).

2.2.2.3 I Confronti Multipli [19, 20]

L'analisi statistica di Friedman indica se le popolazioni risultano diverse tra loro attraverso l'analisi del p-value α .

Un valore di α minore del p-value critico indica che le popolazioni sono diverse tra di loro, ma non indica quali. A questo scopo, quando viene individuata una differenza significativa vengono effettuati confronti multipli, dove le popolazioni sono confrontate a coppie.

In aggiunta, se si applicasse un t-test classico in questa condizione si userebbe lo stesso intervallo di confidenza ($\alpha=0.05$) ad ogni confronto. Così facendo, la probabilità di trovare differenze significative, quando in realtà non ci sono, aumenterebbe con l'aumentare del numero dei confronti.

Le procedure di confronti multipli sono progettate per fornire un limite superiore alla probabilità che ogni confronto sia classificato non correttamente come significativo.

La grandezza utilizzata per effettuare il confronto tra le coppie di popolazioni è l'”honestly significant difference” (HSD) formulata da Tukey.

$$HSD = Q_{(\alpha,k,df)} \sqrt{\frac{S_e^2}{n}} \quad (2.6)$$

Dove:

$Q_{(\alpha,k,df)}$	è il valore Q studentizzato
α	è l'intervallo di confidenza
k	è il numero di medie a confronto
df	è il numero dei gradi di libertà della varianza residua (data dalla differenza tra il numero di misure e il numero di medie da confrontare)
S_e^2	è la varianza residua
n	è la numerosità campionaria di ciascun gruppo

Calcolato *HSD* lo si confronta con la differenza tra le medie (per metodi parametrici), o la differenza tra le medie dei ranghi (per metodi non parametrici).

Se la differenza tra le medie è maggiore di *HSD* allora la coppia è significativa, cioè le medie sono significativamente differenti, se è minore al contrario le medie sono uguali.

2.2.2.4 Effetto della stimolazione

Obiettivo di questo confronto è verificare se ci sono differenze significative tra le potenze estratte in diverse condizioni di stimolazione.

Il test statistico viene condotto sui dati di tutti i soggetti considerando come fattore il tipo di stimolazione (Baseline, Sham, PostAnodica, non si considera l'anodica) e mantenendo fisse frequenza e colore. Ciò significa che il test di Friedman verrà condotto per 6 volte (12 Hz, 15 Hz, 20 Hz Rosso, 12 Hz, 15 Hz, 20 Hz Giallo). A valle vengono effettuati i confronti multipli fra le varie popolazioni.

I dati vengono raccolti in una matrice $N \times S$ dove N è il numero di misure considerate dopo l'analisi esplorativa e $S=3$ è il numero di condizioni di stimolazione (Baseline, Sham, PostAnodica).

2.2.2.5 Effetto della frequenza

L'obiettivo di questa indagine è quello di verificare se ci sono differenze tra le 3 diverse frequenze di stimolazione luminosa.

I dati vengono raccolti in una matrice $M \times F$, dove M è il numero delle prove effettuate, che considerano tutti i soggetti in tutte le condizioni di stimolazione tDCS e di stimolazione luminosa (colore rosso e giallo) ed $F=3$ è il numero delle frequenze con cui i soggetti sono stati stimolati.

2.2.2.6 Effetto del colore

L'ultimo passo dell'analisi statistica si prefigge di osservare se il colore dei quadrati lampeggianti causa o meno differenze tra le popolazioni delle potenze.

I dati sono contenuti in una matrice $L \times C$ dove L è il numero di prove selezionate dall'analisi esplorativa, mentre $C=2$ è il numero di colori. I dati relativi ad ogni colore accorpano le potenze relative a tutti i soggetti al variare delle condizioni di stimolazione tDCS e delle frequenze.

Capitolo 3

Risultati

In questo capitolo vengono riportati i risultati ottenuti dall'elaborazione dei dati ottenuti dalla registrazione dei SSVEP.

Il capitolo è articolato in due parti: analisi esplorativa ed analisi statistica. La prima mostra i grafici ottenuti mediando gli spettri relativi a tutti e 6 i soggetti. La seconda interpreta i dati relativi alla potenza contenuta nelle bande relative alle frequenze di stimolazione, considerando l'effetto stimolazione, l'effetto frequenza e l'effetto colore

3.1 Analisi Esplorativa

Con l'analisi esplorativa è stato valutato ogni trial di ogni soggetto e sono stati scartati tutti i trial artefattuali. Da quest'analisi è stato possibile osservare come gli spettri estratti dalla configurazione di stimolazione Anodica non sono utilizzabili per la successiva analisi statistica in quanto troppo condizionati dalla presenza della stimolazione elettrica.

In Figura 3.1 si può osservare un esempio dell'anadamento delle PSD delle quattro condizioni di stimolazione messe a confronto per la configurazione 12 Hz-Rosso.

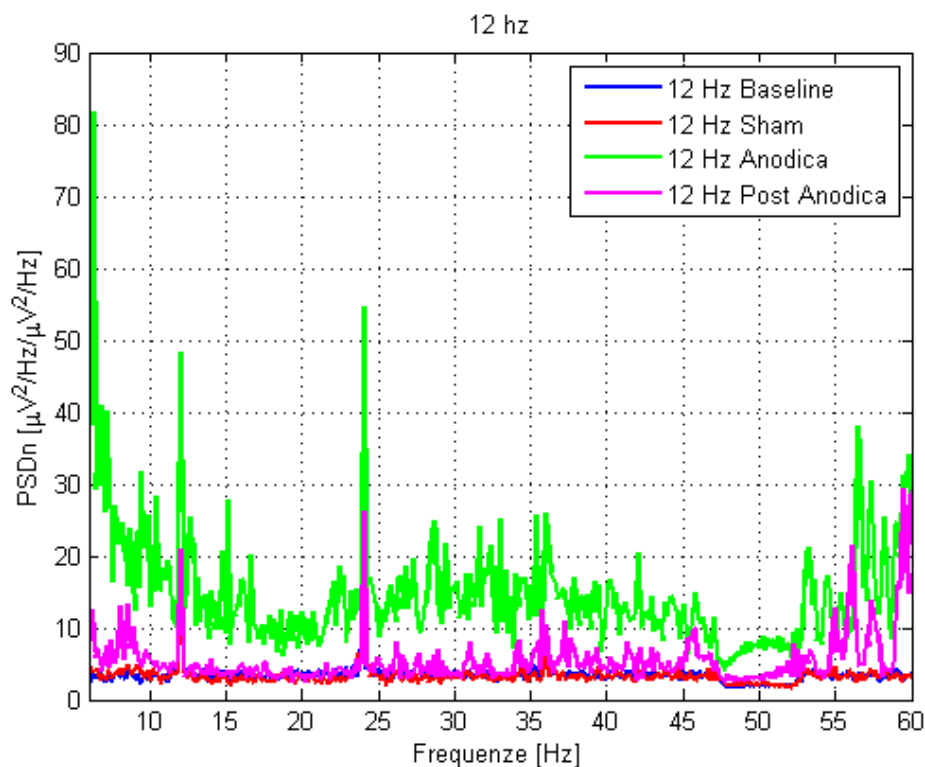


Figura 3.1 Confronto tra stimolazioni 12 Hz-Rosso. Si noti come la PSDn nella condizione anodica sia inutilizzabile

Questo esempio ha lo scopo di mostrare che tpo di disturbo introduce la stimolazione durante la registrazione. Questo andamento è stato riscontrato nella maggior parte delle sessioni. Solo in pochissime sessioni la stimolazione non ha riportato degli effetti compromettenti sullo spettro del segnale, per cui avendo a disposizione solo pochi dati l'analisi statistica non è stata condotta per la modalità di stimolazione anodica. In figura 3.2 si riporta per completezza l'andamento delle PSDn nelle quattro condizioni di stimolazione per uno dei casi in cui la stimolazione non ha interferito con la registrazione. Da questo punto in poi si decide quindi di abbandonare completamente l'analisi della condizione stimolazione anodica e ci si concentrerà esclusivamente sull'analisi delle tre restanti condizioni: Baseline, Sham e Post Anodica.

I grafici di seguito riportati mostrano gli spettri di densità di potenza (PSD) normalizzati rispetto alla PSD a riposo (PSD in fase di rest) estratta in condizioni Baseline. I grafici riportati sono stati ottenuti mediando gli spettri delle PSDn di tutti i soggetti.

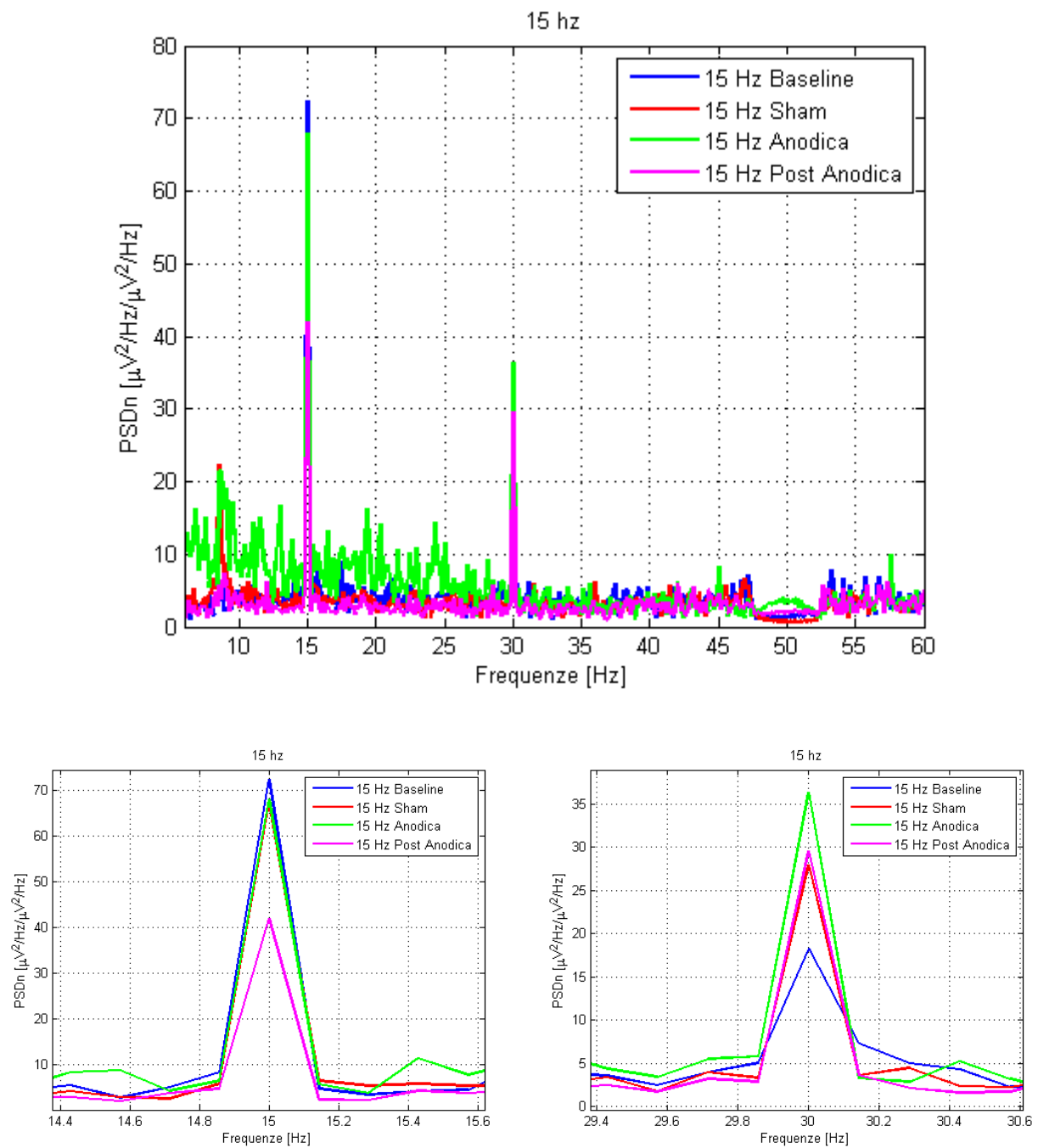


Figura 3.2 PSDn 15 Hz-Giallo di un singolo soggetto con anodica. Spettro complessivo. Zoom sulla 1° armonica. Zoom sulla 2° armonica.

3.1.1 Confronto tra stimolazioni: 12 Hz-Rosso

Di seguito vengono riportati gli spettri relativi alle PSDn estratti in configurazione 12 Hz-Rosso (Figura 3.3). Il picco che si manifesta in corrispondenza alla 2° armonica è quello che ha ampiezza maggiore e la PSDn relativa alla condizione Baseline raggiunge il valore di circa 35. La PSDn corrispondente all'armonica fondamentale presenta un valore più basso rispetto alla seconda armonica.

1° Armonica

La stimolazione Baseline (in blu) e la stimolazione Post Anodica (magenta) sono pressochè sovrapposte (picco circa a 17), mentre quella Sham (in rosso) si trova leggermente al di sotto.

2° Armonica

In corrispondenza della seconda armonica si può notare un picco più elevato della PSDn in condizione Baseline (35) rispetto alla stimolazione Sham e a quella Post Anodica (25). In questa combinazione di frequenza e colore, queste ultime sono pressochè sovrapposte.

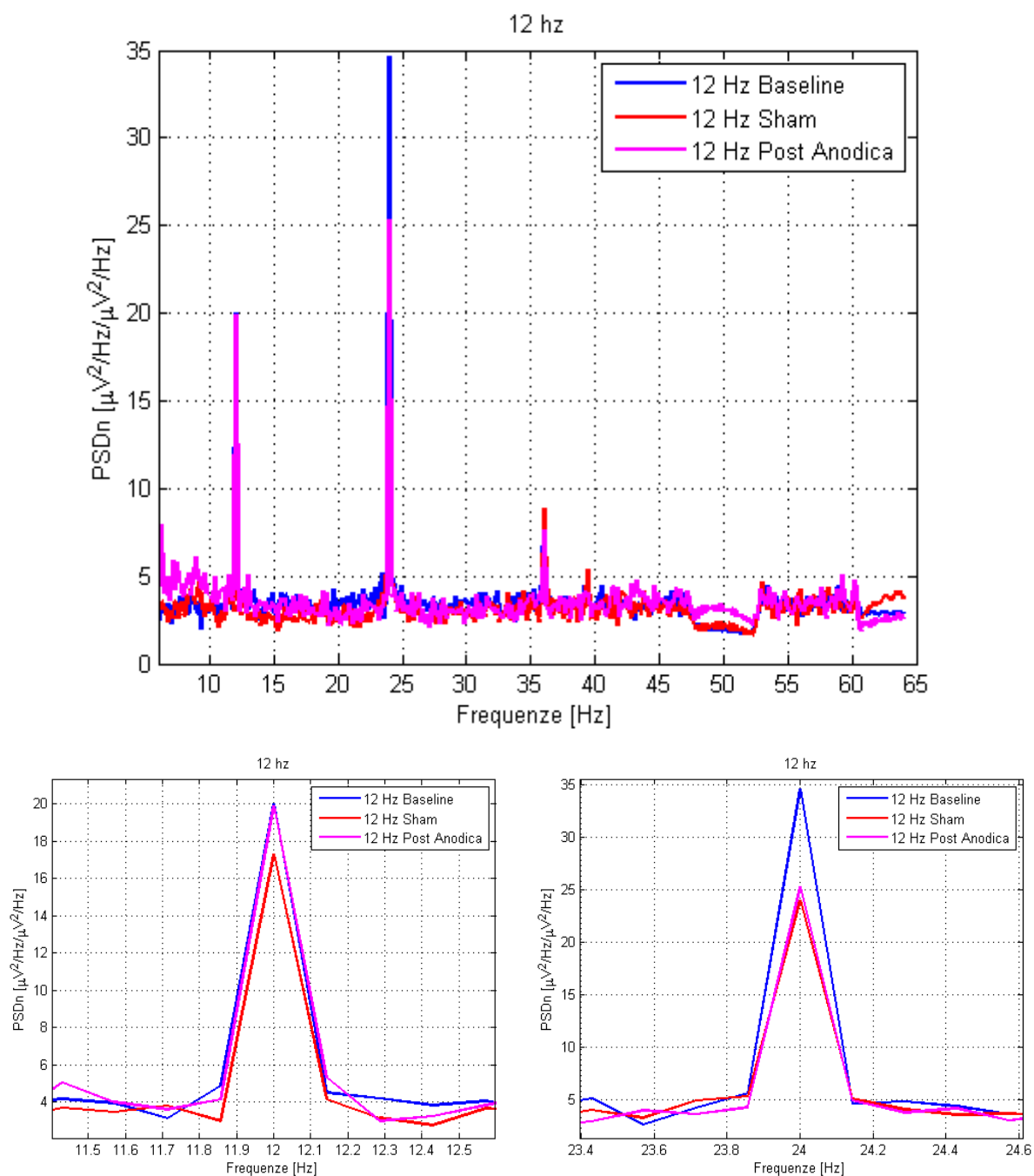


Figura 3.3 PSDn 12 Hz-Rosso mediata su tutti i soggetti. Spettro complessivo. Zoom sulla 1° armonica. Zoom sulla 2° armonica.

3.1.2 Confronto tra stimolazioni:15 Hz-Rosso

In questa sezione vengono riportati gli spettri relativi alla stimolazione luminosa effettuata con quadrati rossi a 15 Hz. Il picco di dimensioni maggiori lo si ha in corrispondenza della seconda armonica in condizioni Baseline. I picchi che si manifestano nella prima armonica risultano più piccoli di quelli presenti nella seconda (Figura 3.4).

1° Armonica

In questa configurazione di stimolazione si possono vedere distintamente i 2 picchi relativi al SSVEP. In particolare, il picco relativo alla condizione Baseline (circa 16) raggiunge una quota più elevata rispetto agli altri (circa 15 per la Sham e 13 per la Post Anodica). Inoltre la PSDn in Baseline e Sham hanno un valore generalmente più elevato rispetto alla PSDn in condizioni Post Anodica nella banda di interesse osservata.

2° Armonica

Il grafico della PSDn riguardante la seconda armonica mostra lo stesso schema che si era presentato nella prima: la condizione Baseline presenta un picco più alto (40, segue la stimolazione Sham (circa a 30 ed infine la condizione Post Anodica (circa a 25); quest'ultima presenta il picco di dimensioni inferiori. I valori di PSDn raggiunti sono superiori rispetto a quelli visti nella prima armonica

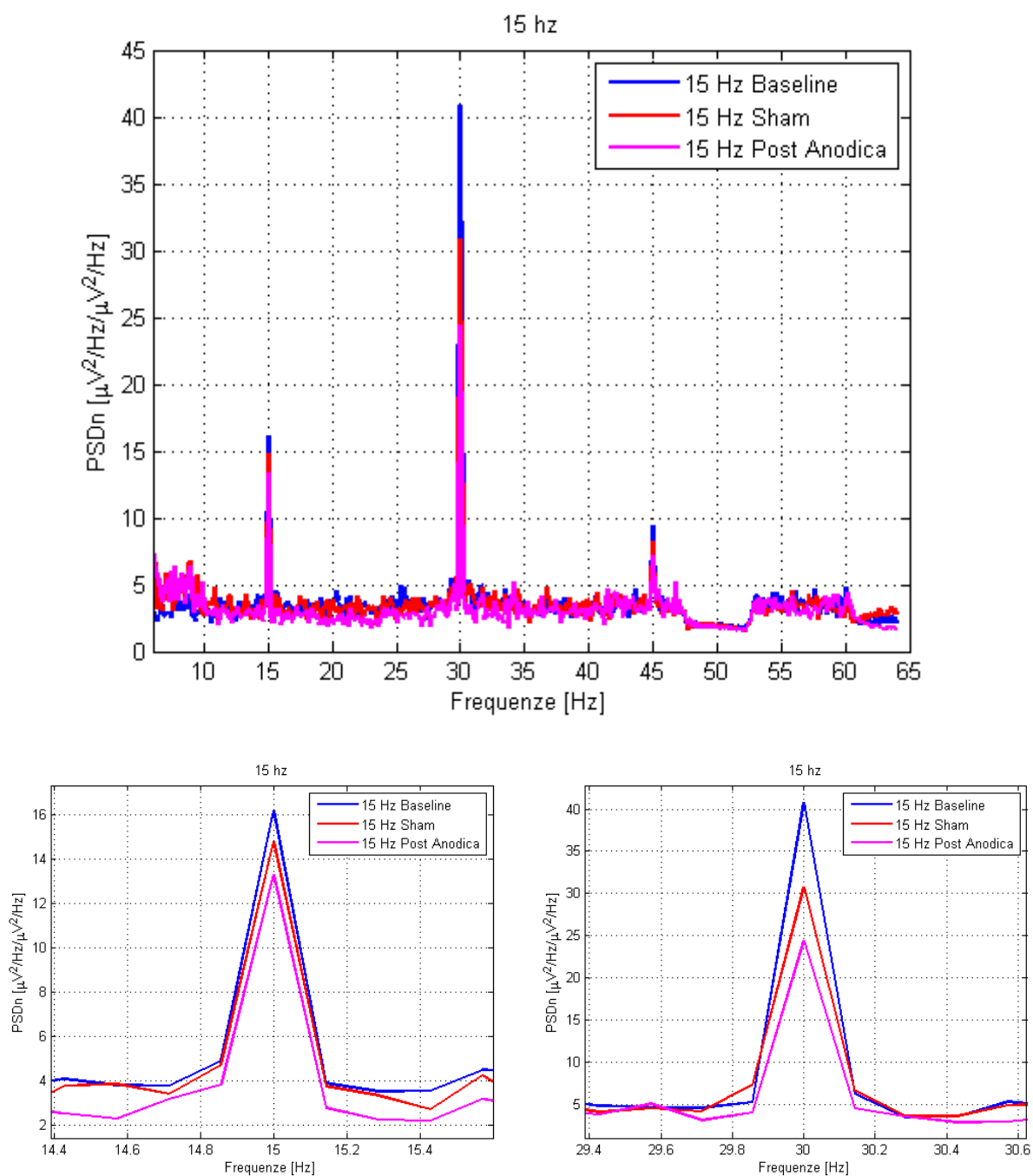


Figura 3.4 PSDn 15 Hz-Rosso mediata su tutti i soggetti. Spettro complessivo. Zoom sulla 1° armonica. Zoom sulla 2° armonica

3.1.3 Confronto tra stimolazioni:20 Hz-Rosso

Il seguente grafico riporta gli spettri di densità di potenza per lo stimolo luminoso rosso a 20 Hz per tutte e tre le condizioni di stimolazione (Figura 3.5). Il picco della seconda armonica presenta un'ampiezza maggiore rispetto alla prima armonica.

1° Armonica

Il picco relativo alla condizione Baseline (circa 15) si trova ad un valore più elevato rispetto alle condizioni di Sham e Post Anodica (circa 12). Inoltre, nella banda di interesse, assume valori generalmente più elevati. L'ampiezza del picco relativo alla PSDn relativa alla Sham non è molto diversa da quella relativa alla condizione Post Anodica. Ciò che cambia è il punto di partenza, che si trova ad un valore più basso. Questo aspetto si evince anche dal grafico complessivo, dove, soprattutto nella zona relativa alla prima armonica, si può vedere come la PSDn relativa alla Baseline si trovi al di sopra sia della stimolazione Sham, sia della PSDn in condizione Post Anodica.

2° Armonica

La 2° armonica relativa alla stimolazione a 20 Hz rossa presenta a differenza di tutte le altre un picco relativo alla condizione Post Anodica (circa 17) più grande rispetto alle condizioni Sham (13) e Baseline (10). Il punto a da cui partono i picchi è pressoché identico, e ciò rende più semplice il confronto sull'ampiezza.

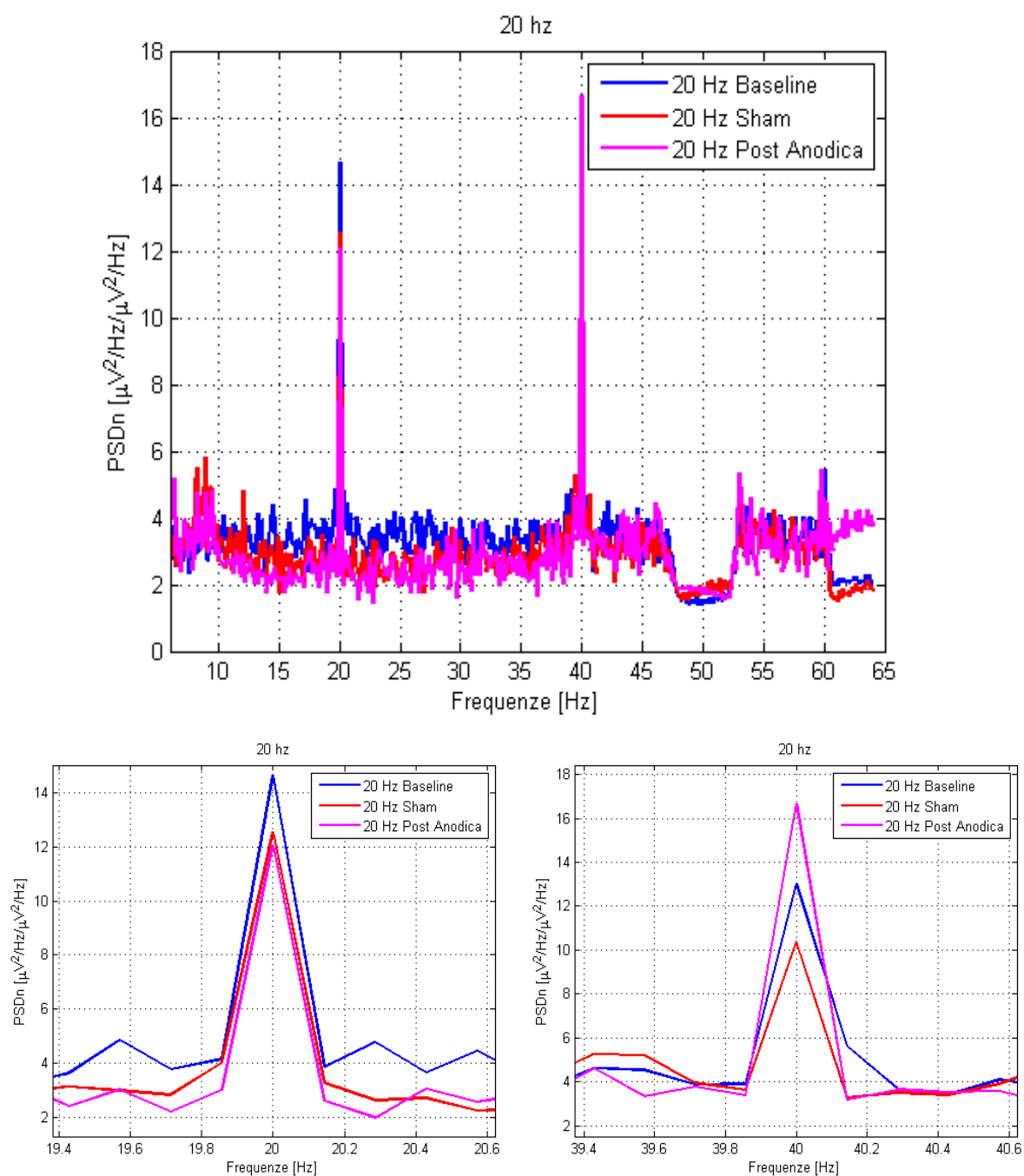


Figura 3.5 PSDn 20 Hz-Rosso mediata su tutti i soggetti. Spettro complessivo. Zoom sulla 1° armonica. Zoom sulla 2° armonica

3.1.4 Confronto tra stimolazioni:12 Hz-Giallo

Verranno di seguito riportati i grafici relativi alla PSDn della stimolazione a 12 Hz Gialla (Figura 3.6). L'armonica che presenta i picchi più elevati è la seconda. Gli spettri sono ben sovrapposti fra loro

1° Armonica

La prima armonica mostra un picco in Baseline (circa 37) più alto rispetto alla Sham (circa 33) e alla Post Anodica (circa 27). Anche in questo caso la PSDn Post Anodica risulta avere un picco più basso rispetto alle altre due condizioni di stimolazione. I tre picchi risultano ben distinguibili tra loro.

2° Armonica

Nella seconda armonica, come nella prima, la PSDn relativa alla stimolazione Baseline risulta quella con il picco più elevato (circa 43), seguono in ordine la PSDn relativa alla stimolazione Sham (picco di poco superiore a 40) e Post Anodica (circa a 38). Diversamente dalla prima armonica i picchi sono più ravvicinati e raggiungono valori più elevati

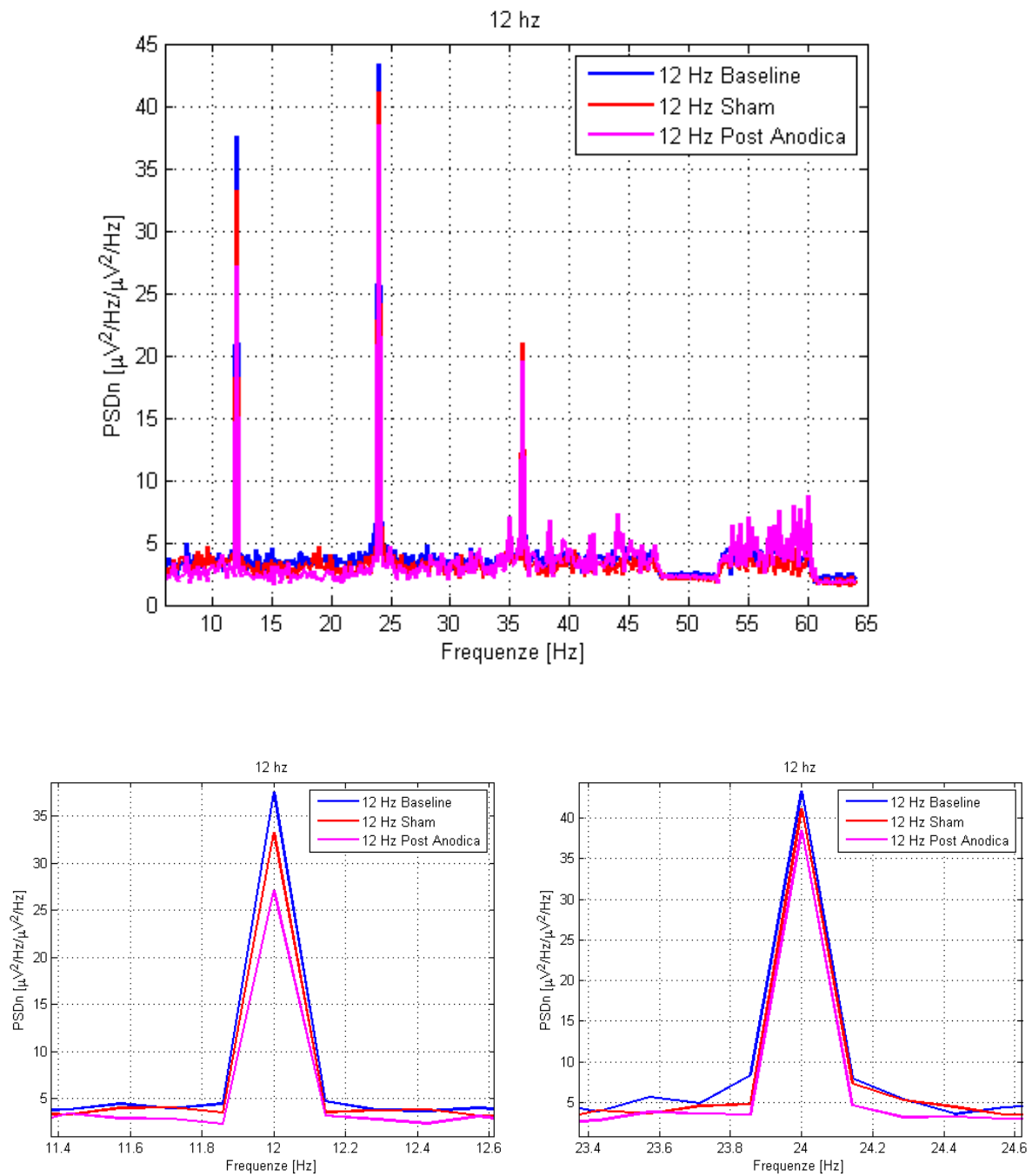


Figura 3.6 PSDn 12 Hz-Gialla mediata su tutti i soggetti. Spettro complessivo. Zoom sulla 1° armonica. Zoom sulla 2° armonica

3.1.5 Confronto tra stimolazioni:15 Hz- Giallo

La stimolazione a 15 Hz con quadrati gialli presenta PSDn relative alle diverse condizioni ben allineate tra loro (Figura 3.7). Questa caratteristica permetterà di fare confronti più diretti tra le ampiezze dei diversi picchi. Il picco di intensità più elevato lo si registra in corrispondenza della prima armonica in condizioni Sham.

1° Armonica

Come anticipato dall'osservazione sull'intero spettro, la prova Sham mostra un picco più elevato, oltre 50, rispetto alle prove Baseline e Post Anodica che si fermano a circa 45; queste ultime risultano pressoché sovrapposte, anche se la Baseline parte e ritorna ad un valore leggermente più alto rispetto alla condizione Post Anodica.

2° Armonica

I picchi rilevati in corrispondenza della seconda armonica presentano un andamento differente da quanto visto nella prima armonica. In questo caso la PSDn Post Anodica (picco a circa 22) risulta ben distinguibile rispetto alla condizione Baseline e Sham e si trova ben al disopra di queste due (picchi di poco superiori a 16).

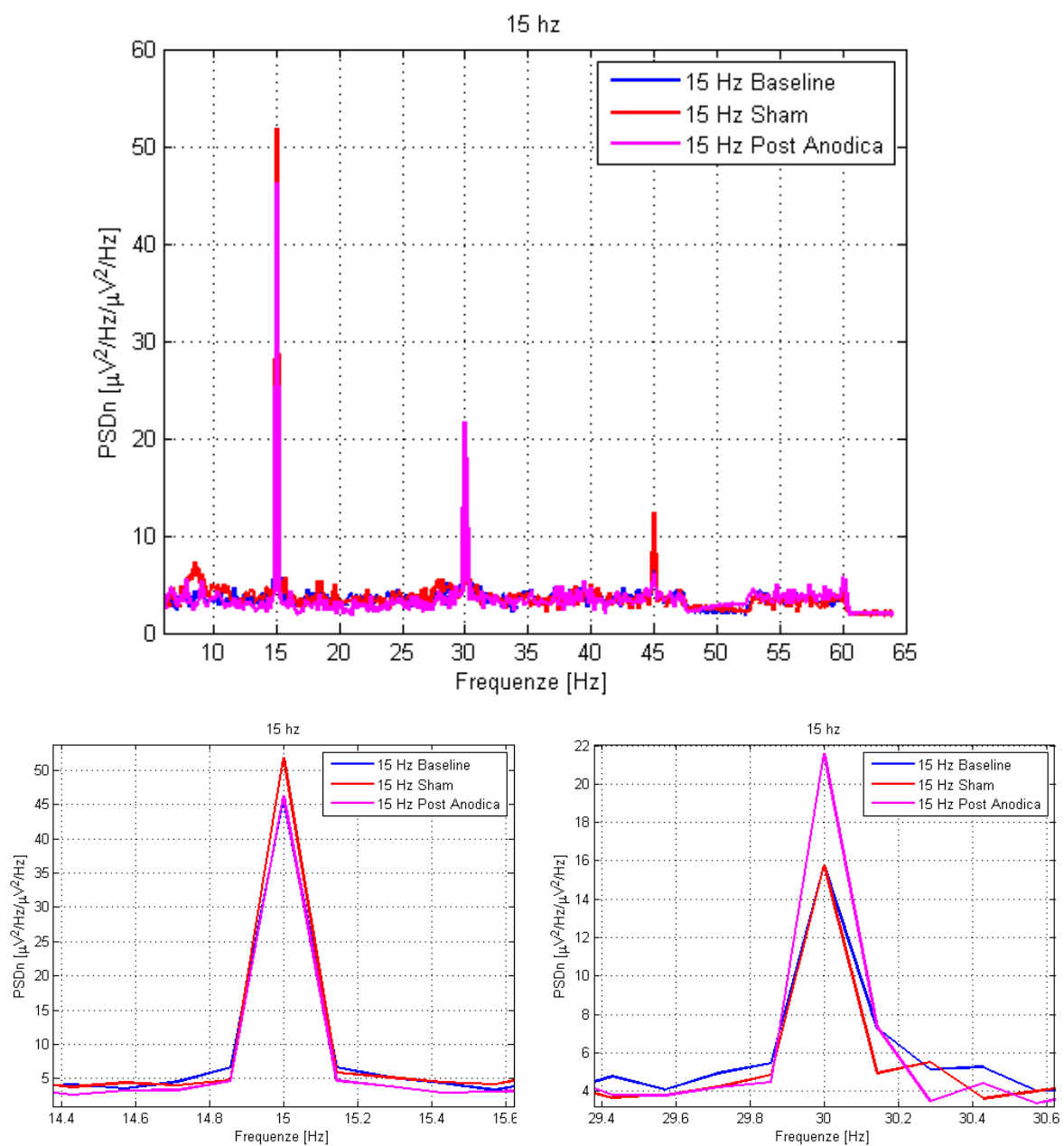


Figura 3.7 PSDn 15 Hz-Gialla mediata su tutti i soggetti. Spettro complessivo. Zoom sulla 1° armonica. Zoom sulla 2° armonica

3.1.6 Confronto tra stimolazioni: 20 Hz- Giallo

In questa sede si descriveranno le PSDn relative alla stimolazione a 20 Hz utilizzando quadrati di colore giallo (Figura 3.8). In questo contesto si può notare un picco spurio alla frequenza 10.39 Hz. Proprio questo valore di frequenza fa escludere la presenza di una sotto armonica, che si troverebbe alla frequenza esatta di 10 Hz. In questo frangente la prima armonica presenta un picco di maggior ampiezza, nella condizione Post Anodica, rispetto ai picchi raggiunti dalla seconda e terza armonica. La Baseline, soprattutto in concomitanza della prima armonica, ha valori nell'intorno del picco più elevati, che permette di distinguerla dalla stimolazione Sham e Post Anodica.

1° Armonica

La prima armonica presenta una quasi totale sovrapposizione delle tre condizioni di stimolazione. Le tre curve sono distinguibili solo nelle adiacenze del picco. I tre valori di picco si avvicinano a 30.

2° Armonica

La seconda armonica presenta la sovrapposizione della prova Baseline e della prova Sham, che toccano all'incirca un valore di picco pari a 16. L'ampiezza del picco relativo alla prova Sham risulta lievemente più elevato, posto che parte da valori lievemente inferiori. La prova Post Anodica risulta ben distinguibile con valori inferiori (circa 9).

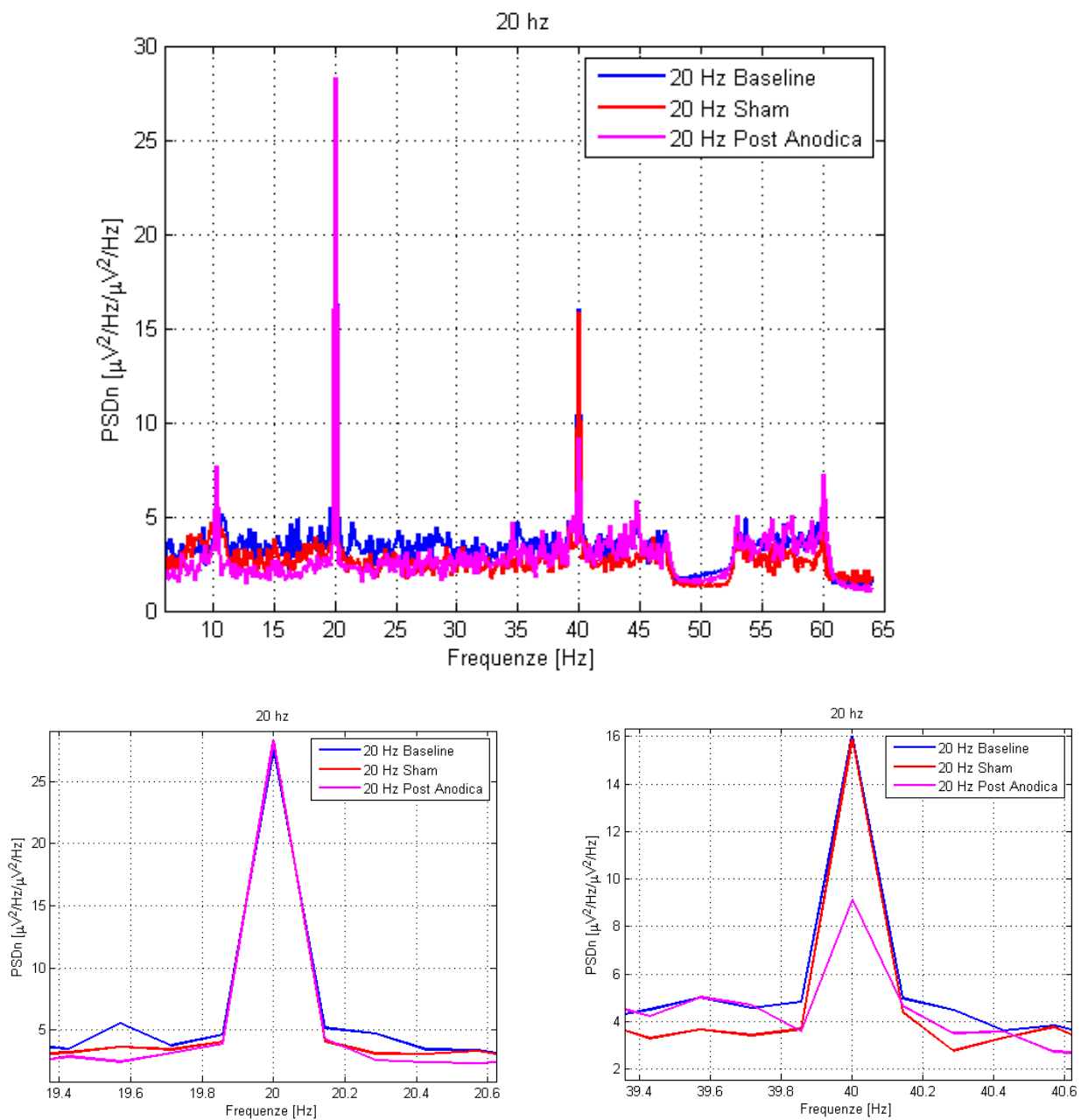


Figura 3.8 PSDn 20 Hz-Gialla mediata su tutti i soggetti. Spettro complessivo. Zoom sulla 1° armonica. Zoom sulla 2° armonica

3.2 Analisi Statistica

In questa sezione si mostrano i risultati relativi all'analisi statistica, effettuata sui dati selezionati a valle dell'analisi esplorativa. L'analisi statistica è articolata in tre fasi distinte: effetto della stimolazione, effetto delle frequenza ed effetto del colore. Lo studio sui tre distinti effetti viene condotto sulla prima e sulla seconda armonica.

L'obiettivo di questa fase dello studio è quello di verificare se ci sono popolazioni significativamente differenti tra loro (attraverso la statistica di Friedman) e, in caso affermativo, quali sono, mediante confronti multipli.

3.2.1 Effetto Stimolazione

In questa sezione le popolazioni che vengono messe a confronto sono i diversi tipi di stimolazione a parità di colore e frequenza. Ne consegue che per ogni armonica considerata verranno condotti 6 test (3 frequenze di stimolazione per 2 colori).

Le grandezze utilizzate come dato per condurre l'analisi statistica sono le potenze estratte nell'intorno della frequenza di interesse (12 Hz, 15 Hz, 20 Hz), di ampiezza 1,14 Hz ($\pm 0,57$ Hz) in condizioni Baseline, Sham e Post Anodica.

Il risultato è considerato significativo (ed è evidenziato da un asterisco) se la condizione Post Anodica risulta significativamente differente sia dalla condizione Baseline, sia dalla condizione Sham.

Effetto stimolazione: 1° Armonica

Dai confronti multipli relativi alla prima armonica (Figura 3.9) si osserva che la stimolazione Post Anodica, quando risulta statisticamente significativa, ha una media dei ranghi valutati sulle singole misure più bassa rispetto alle condizioni Baseline e Sham.

In particolare:

- 12 Hz Rosso: tutte e tre le popolazioni non sono significativamente differenti
- 15 Hz Rosso: Baseline e Sham non sono significativamente differenti, la prova Post Anodica è differente rispetto ad entrambe
- 20 Hz Rosso: La prova Post Anodica è statisticamente differente rispetto alla prova Baseline, ma non rispetto alla Sham
- 12 Hz Giallo: la prova Post Anodica è significativamente differente dalle condizioni Baseline e Sham, che non lo sono tra loro
- 15 Hz Giallo: Tutte e tre le stimolazioni sono significativamente differenti tra loro
- 20 Hz Giallo: la prova Post Anodica è significativamente differente dalle condizioni Baseline e Sham

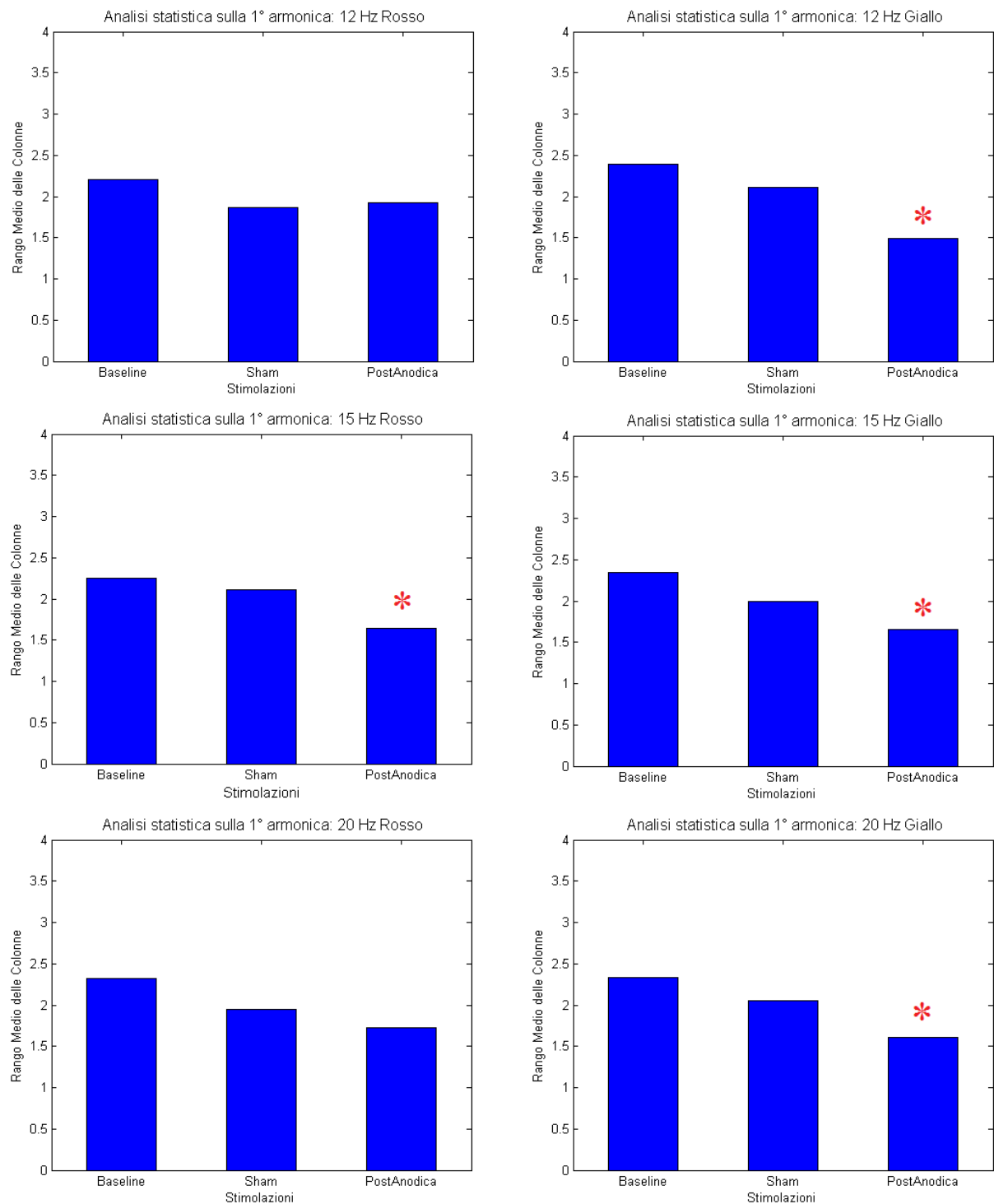


Figura 3.9 Effetto Stimolazione: risultati dell'analisi statistica per la 1° Armonica

I risultati relativi all'analisi statistica condotta sull'effetto della stimolazione nella prima armonica sono sintetizzati nella seguente tabella (Tabella 3.1):

FREQUENZA	COLORE	
	ROSSO	GIALLO
12 Hz	Non ci sono differenze significative	La Condizione Post Anodica è statisticamente significativa (<)
15 Hz	La Condizione Post Anodica è statisticamente significativa (<)	La Condizione Post Anodica è statisticamente significativa(<)
20 Hz	Non ci sono differenze significative	La Condizione Post Anodica è statisticamente significativa (<)

Tabella 3.1 Effetto Stimolazione: Risultati per la 1° Armonica

Effetto stimolazione: 2° Armonica

Anche nell'analisi dell'effetto della stimolazione nella seconda armonica (Figura 3.10), la condizione Post Anodica, quando si rivela statisticamente significativa, ha valori relativi alla media dei ranghi inferiore rispetto a Baseline e Sham.

In particolare:

- 12 Hz Rosso: la prova Post Anodica e la prova Sham non sono statisticamente differenti, ma lo sono rispetto alla prova Baseline
- 15 Hz Rosso: Baseline e Sham non sono significativamente differenti, la prova Post Anodica è differente rispetto ad entrambe
- 20 Hz Rosso: La prova Post Anodica è statisticamente differente rispetto alla prova Baseline, ma non rispetto alla Sham
- 12 Hz Giallo: Tutte e tre le stimolazioni sono significativamente differenti tra loro
- 15 Hz Giallo: La prova Post Anodica è statisticamente differente rispetto alla prova Baseline, ma non rispetto alla Sham
- 20 Hz Giallo: Tutte e tre le stimolazioni sono significativamente differenti tra loro.

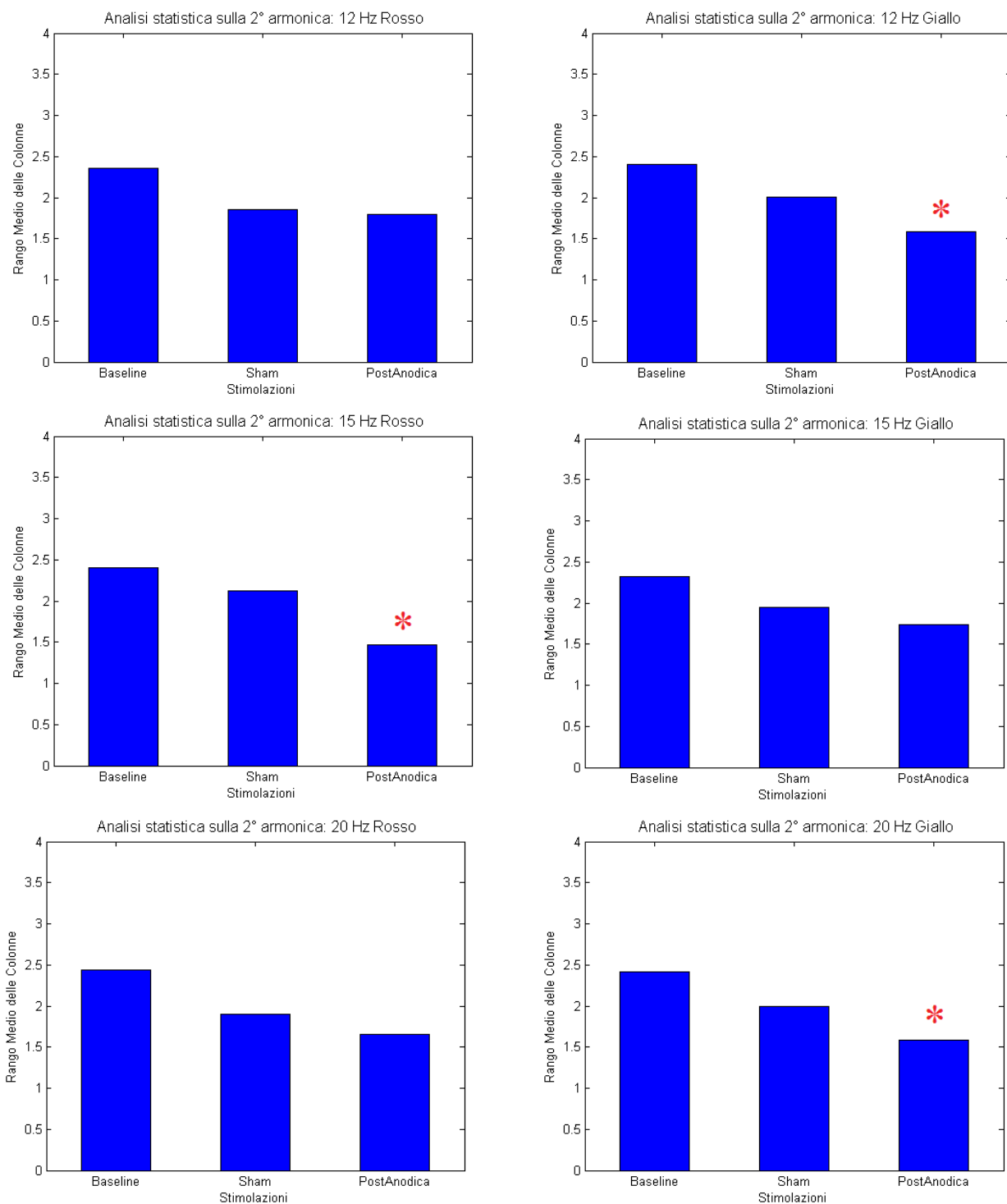


Figura 3.10 Effetto Stimolazione :Risultati dell'analisi statistica per la 2° Armonica

I risultati relativi all'analisi statistica condotta sull'effetto della stimolazione nella seconda armonica sono sintetizzati nella seguente tabella (Tabella 3.2):

FREQUENZA	COLORE	
	ROSSO	GIALLO
12 Hz	Non ci sono differenze significative	La Condizione Post Anodica è statisticamente significativa (<)
15 Hz	La Condizione Post Anodica è statisticamente significativa (<)	Non ci sono differenze significative
20 Hz	Non ci sono differenze significative	La Condizione Post Anodica è statisticamente significativa (<)

Tabella 3.2 Effetto Stimolazione: Risultati per la 2° Armonica

3.2.2 Effetto frequenza

In questo paragrafo si va ad osservare se le frequenze di flickering dei quadrati lampeggianti determinano degli effetti sulle potenze misurate. Le popolazioni che si vanno a confrontare sono ottenute accorpando i dati secondo la frequenza; ogni colonna della matrice su cui viene effettuata l'analisi statistica contiene quindi tutti e tre i tipi di stimolazione (Baseline, Sham, Post Anodica) ed entrambi i colori (Rosso e Giallo) poiché questi non sono i fattori che si vogliono studiare in questo contesto.

Effetto frequenza: 1° Armonica

L'analisi statistica condotta sui dati suddivisi in base alle frequenze indica che le tre popolazioni non sono significativamente differenti tra di loro (Figura 3.11).

Effetto frequenza: 2° Armonica

L'esito dell'analisi statistica condotto sulla seconda armonica è allineato a quello della prima: le tre popolazioni alle tre differenti frequenze non sono significativamente differenti tra di loro (Figura 3.11).

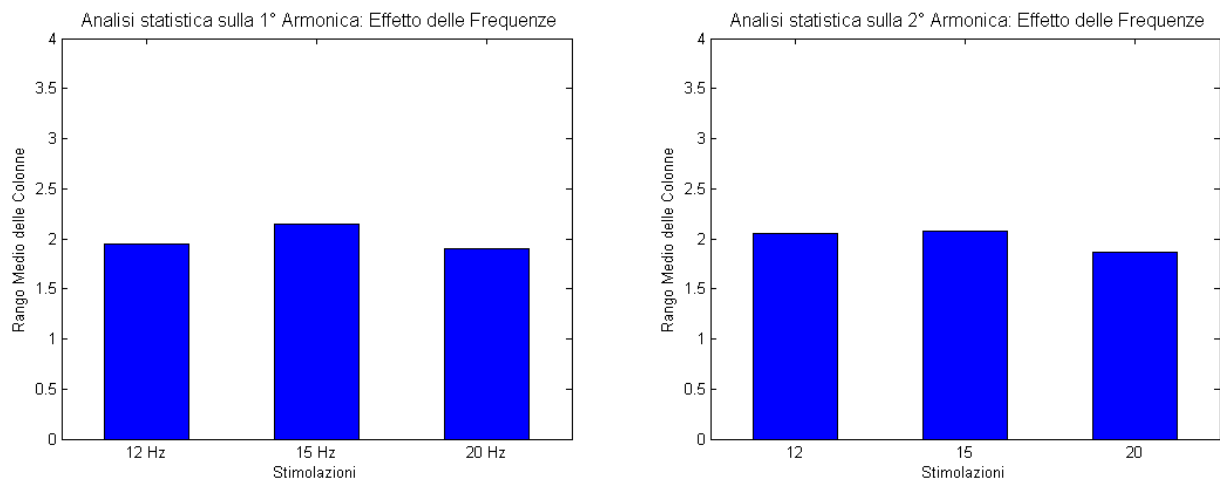


Figura 3.11 Effetto Frequenza :Risultati dell'analisi statistica per la 1° e per la 2° Armonica

3.2.3 Effetto Colore

L'indagine che viene condotta in questa sezione riguarda il colore. Ci si chiede cioè se il colore costituisce una caratteristica in grado di permettere di discriminare le due popolazioni di potenze. Ogni popolazione quindi include tutti i tipi di stimolazione e tutti i tipi di frequenze.

Di seguito vengono riportati gli esiti della'analisi statistica condotti sulla prima e sulla seconda armonica (Figura 3.12).

Effetto colore: 1° Armonica

L'analisi statistica indica che le due popolazioni sono significativamente differenti tra loro. In particolare, la popolazione relativa alle stimolazioni luminose effettuate con i quadrati di colore giallo risulta avere un rango medio della colonna maggiore rispetto alla popolazione relativa alla stimolazione rossa.

Effetto colore: 2° Armonica

L'analisi statistica condotta sulla seconda armonica indica esiti differenti rispetto alla prima armonica. In questa circostanza le due popolazioni non sono statisticamente differenti.

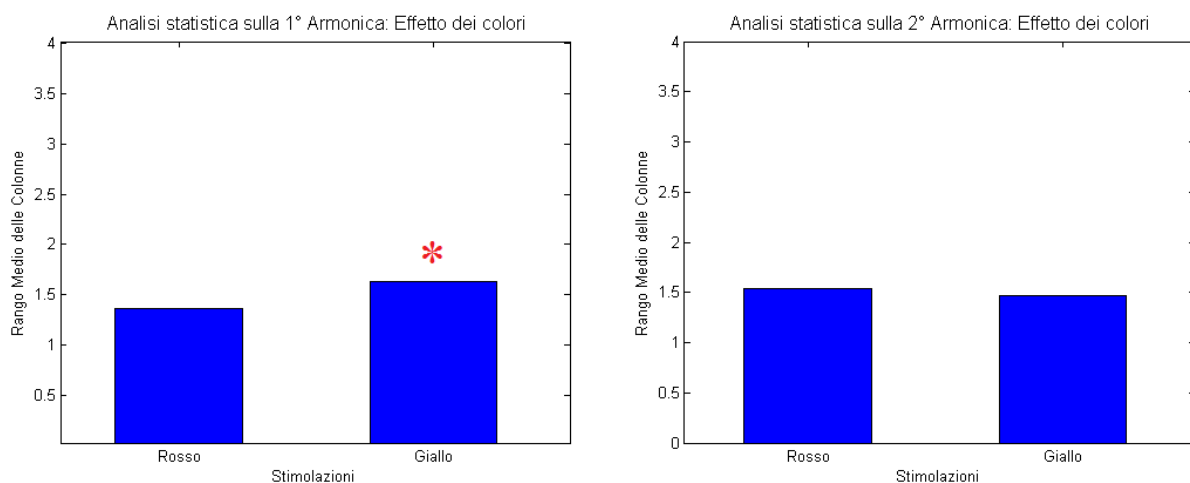


Figura 3.12 Effetto Colore :Risultati dell'analisi statistica per la 1° e per la 2° Armonica

Conclusioni

La stimolazione transcranica a corrente continua (tDCS) è una tecnica di stimolazione cerebrale non invasiva che ha dimostrato effetti terapeutici iniziali in diverse condizioni neurologiche. Il principale meccanismo alla base di questi effetti terapeutici è la modulazione dell'eccitabilità corticale. L'idea di questo lavoro è quella di studiare in che modo queste variazioni dell'eccitabilità corticale si ripercuotono sui potenziali evocati visivi steady state (SSVEP). Il potenziale evocato visivo è un potenziale che riflette i meccanismi elettrofisiologici del processo di elaborazione dell'informazione visiva a livello cerebrale. Il potenziale SSVEP è molto utilizzato nel contesto delle BCI: al soggetto vengono presentate più sorgenti luminose lampeggianti a frequenze diverse, associando a ciascuna di esse una funzione. Il soggetto è in grado di attivare una funzione fissando la sorgente desiderata.

Monitorando gli effetti della tDCS sui potenziali evocati SSVEP si possono quindi:

- Meglio comprendere i processi neurofisiologici e le loro modificazioni che derivano dalla stimolazione con la tDCS

- Cercare quei parametri di stimolazione ottimale che consentano di ottenere dei SSVEP quanto più discriminabili possibili con lo scopo di migliorare le performance delle BCI basate su questo principio

L'obiettivo di questo studio è stato quello di osservare gli effetti della stimolazione anodica tDCS nei SSVEP misurati attraverso EEG e analizzati nel dominio delle frequenze. Lo studio è stato quindi suddiviso in due parti:

1. Nella prima parte dello studio è stato necessario realizzare un sistema che fosse in grado di generare e registrare i SSVEP. A tale fine è stato implementato uno scenario utilizzando il linguaggio di programmazione openVIBE per la generazione degli stimoli luminosi. Il segnale EEG è stato registrato gestendo opportunamente la sincronizzazione con gli stimoli luminosi ed è stato elaborato in MATLAB per estrarre i potenziali SSVEP.
2. Il secondo passo è stato quindi quello di studiare gli effetti della tDCS. Sono state messe a confronto quattro condizioni (Baseline, Sham, Anodica e Post Anodica), tre frequenze di flickering (12, 15 e 20 Hz) e due colori per gli stimoli luminosi (Rosso e Giallo). Dopo aver valutato la criticità dell'acquisizione del segnale EEG durante la stimolazione Anodica, si è deciso di trascurare i dati acquisiti in tale condizione. L'analisi statistica è stata quindi condotta confrontando le restanti tre condizioni di stimolazione: Baseline, Sham e Post Anodica. Confrontando le modalità di stimolazione, i risultati trovati evidenziano che non sono mai presenti effetti significativi tra la Baseline e la Sham, sono invece presenti degli effetti significativi tra Post Anodica e Baseline e Post Anodica e Sham. In particolare i picchi dei SSVEP risultano diminuire. Lo studio sull'effetto delle frequenze ha evidenziato che le potenze relative alle tre frequenze di stimolazione luminosa, non hanno degli effetti significativi. L'analisi sul colore, infine, ha dato esiti differenti. La prima armonica mostra che la stimolazione gialla produce dei picchi dei SSVEP più grandi rispetto alla

stimolazione rossa. Nella seconda armonica non si registrano sostanziali differenze.

Lo studio ha consentito di individuare un buon protocollo di somministrazione degli stimoli luminosi che consente di ottenere PSD con spettri puliti e picchi ben evidenti in corrispondenza della frequenza di stimolazione, sia per l'armonica fondamentale, sia per la seconda armonica. Lo studio ha inoltre evidenziato che la tDCS provoca degli effetti su questi potenziali, dando quindi spazio a ulteriori ricerche sulla scelta dei parametri ottimali di stimolazione. Infatti sarebbe stato auspicabile trovare un effetto contrario sui SSVEP, ma grazie a questo studio si può pensare di cercare quale sia l'effetto della stimolazione catodica attendendo dei risultati opposti. L'ipotesi iniziale di utilizzare una stimolazione anodica per ottenere un aumento dei potenziali SSVEP, basata sui risultati di Antal [1], si è quindi rivelata non corretta. Come precedentemente detto, Antal aveva registrato una diminuzione statisticamente significativa dei VEP dopo la stimolazione catodica e un aumento non significativo dopo una stimolazione anodica. La spiegazione che ci siamo dati per giustificare questo disaccordo nei risultati sta nella polarità del montaggio utilizzato. Nel nostro studio il montaggio utilizzato è extra-cefalico su Oz e braccio destro, siamo quindi certi della provenienza dell'effetto: stimolazione anodica su Oz. Antal usa un montaggio cefalico con anodo e catodo alternatamente su Oz e Cz. In questo modo non si può essere certi dell'area che genera l'effetto, essendo queste molto vicine, quindi durante la stimolazione catodica su Oz, si può comunque avere un effetto della stimolazione anodica su Cz e viceversa.

Lo studio presenta però alcuni limiti:

- Un aspetto critico di questo lavoro risiede nel setting sperimentale, in particolare nella fase di stimolazione anodica combinata all'EEG. È proprio in questa fase che si riscontrano i problemi di natura tecnica maggiore: la vicinanza tra l'anodo, collocato in Oz e gli elettrodi di acquisizione situati sullo scalpo, hanno una posizione molto ravvicinata: capita spesso che la corrente di stimolazione

faccia comportare in maniera anomala gli elettrodi, rendendo così inutilizzabile la sessione acquisita. In aggiunta non sempre è immediato accorgersi del rumore introdotto dalla corrente e solo in fase di analisi esplorativa è possibile osservarlo in modo chiaro.

- Un ulteriore vincolo è dato dall'impossibilità di effettuare più sessioni nello stesso giorno, in quanto è necessario far svanire l'effetto della stimolazione prima di risomministrare una nuova erogazione di corrente per evitare di attribuire eventuali effetti ottenuti al trattamento sbagliato
- Non è stata considerata la modalità di stimolazione catodica.

Nonostante ciò lo studio condotto rappresenta un buon punto di partenza per ulteriori approfondimenti e analisi.

Dalle criticità emerse è possibile individuare gli aspetti su cui poter lavorare in ottica futura: il focus va in prima istanza alla combinazione della stimolazione in corrente con l'acquisizione dell'EEG. È stato messo in mostra che acquisire SSVEP è possibile durante questa fase, ma che vanno adottati ulteriori accorgimenti per rendere più robusto il segnale, come un migliore isolamento tra gli elettrodi di acquisizione e di stimolazione. Infatti solo tre soggetti su sei hanno mostrato un tracciato buono in questa condizione ma non per tutte le combinazioni di frequenze e colori.

In secondo luogo la significatività dei SSVEP relativi ad ogni singolo trial può essere valutata in maniera più oggettiva tramite metodi statistici (statistica di Victor-Mast [21]) che in questa sede non sono stati adottati in favore di un'analisi visuale, quindi operatore dipendente.

In conclusione, questo lavoro si pone come punto di partenza per uno studio più esteso sui SSVEP. Uno sviluppo ingegneristico è senza dubbio la progettazione di una BCI che sfrutti questo segnale come input.

Bibliografia

[1] Antal A, Varga ET, Kincses TZ, Nitsche MA, Paulus W. 'Oscillatory brain activity and transcranial direct current stimulation in humans'. Neuroreport 2004;15:1307-1310.

[2] Accornero N, Li Voti P, La Riccia M, Gregori B. 'Visual evoked potentials modulation during direct current cortical polarization'. Exp Brain Res 2007;178:261-266.

[3] F.Piccolo 'Analisi parametrica multivariata del segnale EEG per la stima della connettività corticale'. Tesi magistrale in ingegneria biomedica Padova. Aa 2011-2012

[4] Basi fisiologiche dei segnali biologici complessi.
<http://fc.units.it/ppb/Segnali/Segnali1.html>

[5] E. Niedermeyer and da Silva F.L. 'Electroencephalography: Basic Principles Clinical Applications, and Related Fields'. 2004

[6] Paul L. Nunez and Ramesh Srinivasan. 'Electric fields of the Brain: the neurophysics of EEG'. Oxford University Press, 2nd edition 2006. New York.

[7] Leif Sorum and Pablo Laguna. 'Bioelectrical signal processing in cardiac and neurological applications'. ELSEVIER 2005.

[8] Electroencephalography. Wikipedia.

[9] Paul L. Nunez. 'Neocortical dynamics and human EEG rhythms'. Oxford University Press, 2nd edition 1995. New York.

[10] Vialatte, Maurice, Dauwels, Cichocki. 'Steady states visually evoked potentials: focus on essential paradigms and future perspectives'. Progress in Neurobiology 90 (2010) 418-438

[11] Mangia A L. Elaborato sulla tDCS. Dottoranda in ingegneria biomedica.

[12] Khymeia NeurowaveManuale d'Uso

[13] OpenViBE: An Open-Source Software Platform to Design, Test and Use Brain-Computer Interfaces in Real and Virtual Environments Renard Y., Lotte F., Gibert G., Congedo M., Maby E., Delannoy V, Bertrand O., L'ecuyer A, Presence Teleoperators and Virtual Environments 19, 1 (2010) 35-53"

[14] Appunti delle lezioni del corso di Elaborazione di dati e segnali biomedici tenute dal professor Ursino nel corso di Laurea Magistrale di Ingegneria Biomedica, Scuola di Ingegneria e Architettura, Cesena

[15] Help di Matlab Test di Lilliefors :lillietest()

[16] Conover, W. J. Practical Nonparametric Statistics. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 1980

[17] Help di Matlab Analisi statistica di Friedman :friedman()

[18] Hollander, M., and D. A. Wolfe. Nonparametric Statistical Methods. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 1999.

[19] Help di Matlab Confronti multipli: multcompare()

[20] Hochberg, Y., and A. C. Tamhane. Multiple Comparison Procedures. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 1987

[21] Victor, J.D., Mast, J., 1991. A new statistic for steady-state evoked potentials. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 78, 378–388.